(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27612 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 33/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10057

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Oktober 2000 (12.10.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

| | | |
|---|---|---|
| 99120351.4 | 12. Oktober 1999 (12.10.1999) | EP |
| 00105592.0 | 16. März 2000 (16.03.2000) | EP |
| 00107028.3 | 31. März 2000 (31.03.2000) | EP |
| 00110110.4 | 10. Mai 2000 (10.05.2000) | EP |

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **CONNEX GESELLSCHAFT ZUR OPTIMIERUNG VON FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG MBH** [DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **REITER, Christian** [DE/DE]; Rathausstr. 8, 85757 Karlsfeld (DE). **CULLMANN, Gerhard** [DE/DE]; Alramstr. 28, 81371 München (DE). **LAKNER, Meret** [DE/DE]; Willibaldstr. 34, 80689 München (DE). **TRÜE, Andreas** [DE/DE]; Landsberger Str. 497, 81241 Pasing (DE). **DEHNERT, Sonja** [DE/DE]; Bad Gasteiner Str. 10, 81373 München (DE). **SCHWARTZ, George** [DE/DE]; Graf-Konrad-Str. 25, 80809 München (DE).

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

(54) **Title:** IMMUNO-CHROMATOGRAPHIC RAPID ASSAY IN ORDER TO DETECT ACID-RESISTANT MICROORGANISMS IN THE STOOL

(54) **Bezeichnung:** IMMUNCHROMATOGRAPHISCHER SCHNELLTEST ZUM NACHWEIS VON SÄURE-RESISTENTEN MIKROORGANISMEN IM STUHL

(57) **Abstract:** The invention relates to a method in order to determine an infection of a mammal with an acid-resistant microorganism comprising the following steps: (a) providing an immuno-chromatographic assay having a sample application region for applying a sample of a mammal with an antigen and application of a stool sample, (b) incubation of the stool sample using (i) a first receptor which under certain conditions, enables formation of a complex of an antigen from said acid-resistant microorganisms with said receptor or (ii) at least two different first receptors under conditions enabling formation of a complex between the antigen from acid-resistant microorganisms with at least two first receptors and whereby the first receptor according to (i) or the first receptors according to (ii) specifically binds an antigen, which has a structure, after passing through the intestinal tract at least a portion of the mammals in which corresponds to the native structure or to the structure against which a mammal produces antibodies after infection or immunization with acid resistant microorganisms or an extract or a lyophilisate thereof or a protein therefrom or a fragment thereof or a synthetic peptide; (c) production of a second receptor immobilized to an analysis region whereby the second receptor binds to an antigen-receptor complex according to (b) and (d) transportation and detection of the formation of at least one antigen-receptor complex according to (b) by accumulating the antigen-receptor complex on the second receptor in the analysis region. The invention also relates to an immunochromatographic assay which in particularly suitable or configured for the implementation of the method according to the invention.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion eines Säugers mit einem Säure-resistenten Mikroorganismus, das folgende Schritte umfaßt : (a) Bereitstellen eines immunchromatographischen Tests mit einem Probenauftragbereich zum Auftragen einer Stuhlprobe des Säugers mit einem Antigen und Auftragen der Stuhlprobe, (b) Inkubieren der Stuhlprobe unter Verwendung (i) eines ersten Rezeptors unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit dem Rezeptor erlauben; oder (ii) mindestens zweier unterschiedlicher erster Rezeptoren unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit den mindestens zwei ersten Rezeptoren erlauben und wobei der erste Rezeptor gemäß (i) oder die ersten Rezeptoren gemäß (ii) ein Antigen spezifisch bindet/binden, das zumindest bei einem Teil der Säuger nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur oder der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert, (c) Bereitstellen eines an einem Analysebereich immobilisierten zweiten Rezeptors, wobei der zweite Rezeptor einen Antigen-Rezeptorkomplex gemäß (b) bindet, und (d) Transportieren und Nachweisen der Bildung mindestens eines Antigen-Rezeptorkomplexes gemäß (b) durch Akkumulieren des Antigen-Rezeptorkomplexes an dem zweiten Rezeptor im Analysebereich. Die Erfindung betrifft ferner einen immunchromatographischen Test, der insbesondere geeignet bzw. ausgebildet ist, um das erfindungsgemäße Verfahren durchzuführen.

WO 01/27612 A2

(74) **Anwalt: VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstr. 4, 81675 München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

# Immunchromatographischer Schnelltest zum Nachweis von Säure-resistenten Mikroorganismen im Stuhl.

In der Beschreibung dieser Erfindung ist eine Anzahl von publizierten Dokumenten genannt. Der Gegenstand dieser Dokumente ist durch Bezugnahme in die Beschreibung inkorporiert.

Die Erfindung betrifft einen immunchromatographischen Schnelltest, insbesondere einen Teststreifen, zum Nachweis einer Infektion eines Säugers mit einem Säure-resistenten Mikroorganismus. Es wird (a) eine Stuhlprobe des Säugers unter Verwendung (aa) eines Rezeptors unter Bedingungen inkubiert, die eine Komplexbildung eines Analyten bzw. eines Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit dem Rezeptor erlauben; oder (ab) mindestens zweier unterschiedlicher Rezeptoren unter Bedingungen inkubiert, die eine Komplexbildung eines Analyten bzw. Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit den mindestens zwei Rezeptoren erlauben und wobei der Rezeptor gemäß (aa) oder die Rezeptoren gemäß (ab) einen Analyten bzw. ein Antigen spezifisch bindet/binden, das zumindest bei einem Teil der Säuger nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur oder der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert; und (b) die Bildung mindestens eines Anlalyten- bzw. Antigen-Rezeptorkomplexes gemäß (a) nachweist. Vorzugsweise ist der Säure-resistente Mikroorganismus ein Bakterium, insbesondere *Helicobacter pylori, Helicobacter hepaticus, Campylobacter jejuni* oder *Mycobacterium tuberculosis.* Ferner bevorzugt ist, daß der Rezeptor/die Rezeptoren an ein Epitop/Epitope einer Katalase, Urease oder Metalloproteinase bindet. Ferner betrifft die Erfindung diagnostische Zusammensetzungen und Testvorrichtungen, die die vorgenannten Komponenten enthalten sowie diese enthaltende Verpackungen.

Der Nachweis der Infektion eines Säugerorganismus mit einem mikrobiellen Pathogen oder Parasiten kann heute auf verschiedene, invasive, semi-invasive oder nicht-invasive Arten geführt werden. Alle invasiven Methoden setzen eine Endoskopie und Biopsie voraus. Beim Einsatz dieser Techniken wird die körperliche Integrität des Untersuchten verletzt, z.B. bei der Entnahme einer Biopsie. Eine Entnahme von Biopsie ist aufwendig, verursacht hohe Kosten und bedeutet meist eine große Belastung für den Patienten. Da die Infektion mit bestimmten Mikroorganismen, beispielsweise mit H. pylori nicht über die gesamte Magenschleimhaut verteilt sein muß, ist durch Biopsie-Entnahme an einer nicht-infizierten Stelle ein falsch-negatives Ergebnis möglich. Ein weiterer Nachteil aller invasiven Methoden ist die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch frühere Behandlung mit Protonenpumpen-Hemmern, Wismut oder Antibiotika.

Semi-invasive oder nicht-invasive Diagnosetechniken stellen Veränderungen in Parametern fest, die ohne einen Eingriff in den Organismus gemessen werden können. Bevorzugt werden hierzu Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen wie Serum, Atemluft, Urin, Speichel, Schweiß oder Stuhl, beprobt und analysiert.

Diagnose-Techniken lassen sich anhand der nachgewiesenen Parameter in direkte und indirekte Methoden einteilen. Bei direkten Methoden wird das Vorhandensein des Pathogens oder Parasiten, seiner Bestandteile oder deren Abbauprodukte durch Elektronenmikroskopie, optische Charakterisierung, Massenspektrometrie, Messung der radioaktiven Zerfallsprodukte oder spezifische enzymatische Reaktionen nachgewiesen. Oft sind diese Verfahren jedoch mit hohem apparativem Aufwand verbunden (z.B. Atemtest). Indirekte Verfahren greifen dagegen auf den Nachweis von Reaktionen des Wirtsorganismus auf das Pathogen oder den Parasiten zurück, z.B. das Vorhandensein von Antikörpern gegen Antigene des Pathogens im Serum oder im Speichel des Wirts.
Nachdem der Eingriff in den Organismus bei invasiven Techniken für den Organismus in den meisten Fällen belastend und häufig auch mit hohem apparativen Aufwand sowie einem gesundheitlichen Risiko verbunden ist, stellen nicht-invasive Techniken durch die vergleichsweise einfache Erfassung von

Proben der oben beschriebenen Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen die Methode der Wahl dar. Da weiterhin nicht jeder Wirt in gleicher Weise auf ein bestimmtes Pathogen oder einen bestimmten Parasiten reagiert, und die Reaktion des Wirts mit Verzögerung einsetzen und zudem auch nach Entfernung des Pathogens oder Parasiten aus dem Organismus persistieren kann, sind direkte Verfahren stets vorzuziehen. Idealerweise wird also eine Diagnose durch den nicht-invasiven, direkten Nachweis des Pathogens oder Parasiten in Körperflüssigkeiten oder Ausscheidungen erstellt. Dies ermöglicht im Gegensatz zu indirekten Verfahren die Bestimmung des aktuellen Infektionsstatus.

Ein diagnostisches Verfahren sollte darüber hinaus auch auf weitere Gesichtspunkte hin optimiert sein: Hohe Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität, garantierte Verfügbarkeit der zu verwendenden Materialien in konstanter Qualität, geringe Kosten bei Herstellung und Durchführung, und einfache Anwendung unabhängig von aufwendigen Apparaturen sind die hier zu berücksichtigenden Parameter.

Aus den oben genannten Gründen nehmen Verfahren basierend auf der hohen Selektivität und Bindungsaffinität bestimmter Substanzklassen (z.B. Antikörper, Rezeptoren, Lektine, Aptamere) für molekulare Strukturen, welche so gewählt werden können, daß sie für den jeweils zu bestimmenden Stoff hochspezifisch sind, in der medizinischen Diagnostik einen zunehmend breiten Raum ein. Insbesondere die Möglichkeit der Immobilisierung dieser Substanzen an Festkörperoberflächen sowie der Kopplung an radioaktive Nuklide, Enzyme, die mit geeigneten Substraten Farbreaktionen auslösen oder an farbige Partikel mit der hochspezifischen Bindungsaffinität (z.B. im ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay) führte zu der Entwicklung kostengünstiger, einfacher und wenig zeitaufwendiger Nachweisverfahren für körpereigene wie körperfremde Stoffe.

In den Anfangsphasen der Entwicklung dieser Nachweisverfahren fanden ausschließlich polyklonale Antikörper Verwendung. Diese haben jedoch einige, dem Fachmann wohlbekannte Nachteile, so vor allem begrenzte Verfügbarkeit und oft auch Kreuzreaktivitäten. Die Erarbeitung von Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler & Milstein (1975)), die Fortschritte bei der

Isolierung von Rezeptoren und deren gerichtete Expression in zellulären Wirtssystemen, die Entwicklung von Lektinen mit hoher Affinität für bestimmte Kohlenhydrate sowie die Entdeckung, daß einzelsträngige Nukleinsäure-Moleküle (Aptamere) molekulare Strukturen spezifisch binden können, konnten diese Nachteile großenteils beseitigen. Heute lassen sich mit vergleichsweise einfachen Methoden die Spezifität und Sensitivität von Nachweisverfahren optimieren.

Aufgrund der hohen Spezifität eignen sich derartige Verfahren besonders zum Nachweis einzelner, definierter Substanzen wie Haptene, Peptide oder Proteine, vorausgesetzt, das erkannte Strukturelement ist konstant innerhalb der zu untersuchenden Probenpopulation und spezifisch für die nachzuweisende Substanz. Sie sind zudem für eine Messung in Körperflüssigkeiten gut geeignet, und stellen damit eine naheliegende Option für den direkten Nachweis von Pathogenen in dieser Probenmatrix dar. Entsprechend sind im Stand der Technik Verfahren zur Diagnose z.B. von *Entamoeba histolytica* (Haque (1993), J. Infect. Dis. 167: 247-9), enterohemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC; Park (1996), J. Clin. Microbiol. 34: 988-990), *Vibrio cholerae* (Hasan (1994), FEMS Microbiol. Lett. 120: 143-148), Torovirus-ähnliche Partikel (Koopmans (1993), J. Clin. Microbiol. 31: 2738-2744) oder *Taenia saginata* (Machnicka (1996), Appl. Parasitol. 37: 106-110) aus Stuhl beschrieben.

Den oben beschriebenen Pathogenen ist gemeinsam, daß sie im Darm ihres Wirts, in allen Fällen dem Menschen, lebens- und vermehrungsfähig sind. Sie besitzen also Mechanismen, die Ihnen das Überleben und die Vermehrung in Anwesenheit der im Darm aktiven Abbau- und Verdauungssysteme erlauben. Damit ist es wahrscheinlich, daß bei der Ausscheidung mit dem Stuhl eine hohe Anzahl intakter oder fast intakter Pathogene bzw. Parasiten abgehen. Mit Nachweisreagenzien, beispielsweise Antikörpern, welche die intakten Pathogene bzw. Parasiten erkennen, können diese im Stuhl oder in aufbereiteten Stuhlproben in der Regel leicht nachgewiesen werden.

Es gibt jedoch eine Anzahl von Pathogenen und Parasiten, die einerseits aufgrund der Beziehungen der von ihnen befallenen Gewebe (z.B. Lunge, Magen, Pankreas, Duodenum, Leber) zum Magen-Darm-Trakt im Stuhl auftreten können, andererseits aber im Darm selbst nicht lebens- und/oder vermehrungsfähig sind.

Zu diesen Pathogenen und Parasiten gehören beispielsweise *Helicobacter pylori (H. pylori)* und *Helicobacter hepatis*, *Mycobacterium tuberculosis* und andere Mycobakterien, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophilae*, *Pneumocystis carinii*, und andere. Andere Pathogene wie beispielsweise *Legionella pneumophilae* lassen sich anhand von Antigenen, die über die Niere in den Urin gelangen spezifisch nachweisen. Dies gelingt jedoch nur, wenn die im Urin befindliche Menge für den Nachweis ausreicht. Der Nachweis im Stuhl wäre hierzu eine begrüßenswerte Alternative. Die Darmpassage ist bei diesen Organismen jedoch mit einem starken Angriff durch die Verdauungs- und Abbaumechanismen der Darmflora verbunden. Für den betrachteten Erreger spezifische molekulare Strukturen können dabei zerstört oder in ihrer Konzentration stark herabgesetzt werden.

Die Degradation der Erreger im Darm hat sich auch bei anderen Säure-resistenten Bakterien als Problem für einen sicheren Nachweis in Stuhlproben erwiesen. Die Zahl der Keime im Magen eines Infizierten ist im Vergleich zu anderen, sich im Darm ansiedelnden Bakterien, gering. Zudem müssen Keime und Keimbruchstücke nach Verlassen des Magens einen langen Weg durch den an Proteasen reichen Darm zurücklegen. Diese Umstände haben zur Folge, daß sich nur geringe Mengen intakter Proteine im Stuhl wiederfinden lassen, wobei man nicht davon ausgehen kann, daß immer die gleichen Fragmente bestimmter Proteine den Darmtrakt unbeschadet durchlaufen. Dies bedingt auch, daß die für einen ELISA- oder immunchromatischen Schnelltest nötige Kombination zweier Epitope auf einem Antigen nicht mehr notwendigerweise wie im nativen Protein gegeben ist, und nah nebeneinander liegende Epitope die größte Wahrscheinlichkeit haben, in einem Nachweis, der zwei Epitope auf dem selben Molekül benötigt, ein positives Ergebnis zu zeigen. Idealerweise wird zum Nachweis nur ein Epitop auf dem selben Molekül benötigt, wobei dieses Epitop im Falle eines Monomers auf diesem zweimal vorhanden sein muß. Im Falle beispielsweise eines Dimers wäre ein einmaliges Vorhandensein auf jeder Untereinheit ausreichend. Die individuell unterschiedliche Verteilung von im Stuhl von Infizierten nachgewiesenen Antigenen weist zusätzlich auf individuelle

Charakteristika in der Prozessierung der Antigene beim Darmdurchgang hin. Ein erster Ansatz, dieses Problem zu verringern, wurde durch den Offenbarungsgehalt der EP-A 0 806 667 bereitgestellt. In dieser Anmeldung wurde gezeigt, daß polyklonale Antikörper mit dem Lysat eines bestimmten *H. pylori*-Stammes induziert werden konnten, die eine breitere Variabilität von Stämmen aus verschiedenen geographischen Regionen erkennen. Allerdings geht aus dieser Anmeldung nicht hervor, welche Antigene durch das Serum erkannt werden. Angesichts der Tatsache, daß Immunseren trotz aller Standardisierungsbemühungen schwanken können, muß das in der o.g. Anmeldung entwickelte Verfahren für eine breite Anwendung als suboptimal betrachtet werden. Hinzu kommt, daß für die Bereitstellung der polyklonalen Seren immer wieder neue Tiere immunisiert werden müssen. Die entsprechenden Verfahren sind sowohl zeit- als auch kostenintensiv.

Idealerweise wäre ein sicherer Nachweis der Infektion eines wie oben erwähnten Säure-resistenten pathogenen Organismus/Parasiten mit einem einzigen oder einer limitierten Anzahl für diesen pathogenen Organismus/Parasiten spezifischen Reagens/Reagentien möglich.

Die EP 291 194 beschreibt ein analytisches Testgerät, das einen porösen Träger mit einem im feuchten Zustand mobilen spezifischen Bindungsreagenz für einen Analyten und ein permanent immobilisiertes, unmarkiertes, spezifisches Bindungsreagenz für den selben Analyten enthält.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist somit, einen entsprechenden einfachen und kostengünstigen Test bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Infektion eines Säugers mit einem Säure-resistenten Mikroorganismus, wobei man (a) eine Stuhlprobe des

Säugers unter Verwendung (aa) eines Rezeptors unter Bedingungen inkubiert, die eine Komplexbildung eines Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit dem Rezeptor erlauben; oder (ab) mindestens zweier unterschiedlicher Rezeptoren unter Bedingungen inkubiert, die eine Komplexbildung eines Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit den mindestens zwei Rezeptoren erlauben und wobei der Rezeptor gemäß (aa) oder die Rezeptoren gemäß (ab) ein Antigen spezifisch bindet/binden, das zumindest bei einem Teil der Säuger nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur oder der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert; und (b) die Bildung mindestens eines Antigen-Rezeptorkomplexes gemäß (a) nachweist.

Der Erfindung liegt außerdem der Gedanke zugrunde, einen immunchromatographischen Schnelltest, wie einen Teststreifen, bereitzustellen, der geeignet ist, einen Nachweis einer genannten Infektion zu liefern.

Der Stuhl-Schnelltest umfaßt mehrere Lagen bzw. Bereiche, die bevorzugt aus gegebenenfalls unterschiedlichen porösen Materialien bestehen. Der Teststreifen weist einen Probenauftrag-Bereich, den eigentlichen Testträger (Test- oder Analysebereich), und eine Absorberschicht (Absorptionsbereich) auf. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die mehreren Lagen bzw. Bereiche auf einem Polyesterträger fest angeordnet. Im Probenauftrag-Bereich befinden sich in einer bevorzugten Ausführungsform in getrocknetem Zustand die für den Nachweis erforderlichen spezifischen immunologischen Rezeptoren oder weiter bevorzugt spezifische Antikörper für das Antigen. Diese sind vorzugsweise mit sichtbar farbigen Partikeln, z.B. kolloidalem Gold oder Polystyrol (Latex) etc., markiert.

Der Testträger besteht weiter bevorzugt aus einer speziellen Testmembran wie z.B. Nitrocellulose. Auf dieser Testmembran sind besonders bevorzugt weitere spezifische Rezeptoren, die gegen das Antigen gerichtet sind, als Testlinie

immobilisiert. Als Funktionskontrolle können auf der Testmembran eine weitere Abfanglinie, beispielsweise gegen den markierten Rezeptor bzw. Antikörper gerichtete Rezeptoren bzw. Antikörper, immobilisiert sein. Eine Absorberschicht am Ende des Teststreifens sorgt vorteilhafterweise dafür, dass der Probenfluss, der auf der Kapillarwirkung der untereinander in Kontakt stehenden porösen Materialien beruht, aufrecht erhalten wird.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren des Sandwich-Immunoassays ist in einer Ausführungsform im Probenauftrag-Bereich des Teststreifens ein markierter erster spezifischer Rezeptor für den Analyten bzw. das Antigen, beispielsweise ein markierter Antikörper (Antikörperkonjugat) deponiert bzw. aufgetrocknet. Als Testlinie ist ein zweiter spezifischer Rezeptor für den Analyten bzw. das Antigen immobilisiert. Während des Tests wird der erste spezifische Rezeptor wie beispielsweise ein Antikörperkonjugat durch die Probenflüssigkeit gelöst und über die Testmembran transportiert. Ist der spezifische Analyt bzw. das Antigen in der Probe vorhanden, bilden sich während des Testlaufs Komplexe aus markiertem ersten Rezeptor bzw. Antikörperkonjugat und Antigen bzw. Analyt aus. An der Abfanglinie bindet dieser Komplex an den zweiten spezifischen Rezeptor und bildet dort den sogenannten Sandwich-Komplex aus. Durch die damit verbundene Akkumulation der markierten Rezeptoren bzw. Antikörperkonjugate an der Testlinie entsteht ein sichtbares Testsignal. Ist kein Analyt bzw. Antigen in der Probe vorhanden, bildet sich kein Sandwich-Komplex aus, und es kommt zu keiner Signalbildung.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Sandwich-Verfahrens ist an der Testlinie anstatt eines spezifischen Rezeptors Streptavidin immobilisiert. Der im einfachen Sandwich-Verfahren als Fänger an der Testlinie eingesetzte spezifische Rezeptor für das Antigen wird an Biotin konjugiert und zusammen mit einem markierten spezifischen Rezeptor im Probenauftrag-Bereich des Teststreifens deponiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Markierung kolloidales Gold. Während der Testdurchführung bildet sich ein Sandwich-Komplex, bestehend aus einem markierten Rezeptor, dem Antigen und dem

Biotin-markierten Rezeptor schon während der Wanderung durch den Probenauftrag-Bereich und der Testmembran aus und wird an der Testlinie über den Biotin-markierten spezifischen Rezeptor durch das dort immobilisierte Streptavidin gebunden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Gold-markierte spezifische Rezeptor in einem ersten Konjugatbereich des Probenauftrag-Bereichs des Teststreifens und der Biotin-markierte spezifische Rezeptor in einem zweiten Konjugat-Bereich des Probenauftrag-Bereichs deponiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der markierte erste spezifische Rezeptor durch einen nicht markierten ersten spezifischen Rezeptor, beispielsweise Antikörper, ersetzt werden. Dieser erste spezifische Rezeptor wird dann durch einen weiteren markierten Rezeptor, der diesen ersten spezifischen Rezeptor bindet, detektiert, wobei der weitere markierte Rezeptor den zweiten spezifischen Rezeptor, der als Testlinie immobilisiert ist, nicht bindet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der an der Testlinie immobilisierte spezifische zweite Rezeptor durch einen nicht immobilisierten zweiten spezifischen Rezeptor, beispielsweise Antikörper, ersetzt werden. Der Analyt-Rezeptorkomplex wird dann durch einen an der Testlinie immobilisierten Rezeptor, der diesen nicht immobilisierten zweiten spezifischen Rezeptor bindet, gebunden, wobei der weitere immobilisierten Rezeptor den ersten markierten spezifischen Rezeptor nicht bindet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt der nicht immobilisierte zweite spezifische Rezeptor gebunden an den an der Testlinie immobilisierten Rezeptor vor.

Bei Verwendung von Antikörpern kann dies beispielsweise dadurch bewerkstelligt werden, daß der erste und zweite spezifische Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen.

Beispielsweise ist der erste spezifische nicht markierte Rezeptor ein Maus-Antikörper, der zweite spezifische Rezeptor ein Kaninchen-Antikörper und der weitere markierte Rezeptor ein anti-Maus-Antikörper.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der spezifische nicht markierte Rezeptor in einem ersten Konjugatbereich des Probenauftrag-Bereichs des Teststreifens und der markierte Rezeptor, der den spezifischen nicht markierten Rezeptor bindet, in einem zweiten Konjungatbereich des Probenauftrag-Bereichs des Teststreifens deponiert.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist im Probenauftrag-Bereich der erste Konjugat-Bereich in Fließrichtung vor oder über dem zweiten Konjugat-Bereich angeordnet.

Besonders geeignet für die Realisierung der vorliegenden Erfindung ist ein Immunchromatographischer Schnelltest. Dieser Test ist ein Trockenreagenztest, wobei alle zur Analyse notwendigen spezifischen Reagenzien in einem aus mehreren porösen Materialien zusammengesetzten Teststreifen vorzugsweise in getrocknetem Zustand enthalten sind. Einem derartigen Test liegt das Prinzip zugrunde, daß die Analyse durch Zugabe einer flüssigen Probe gestartet wird und die Probenflüssigkeit aufgrund von Kapillarkräften durch einen aus mehreren porösen Materialien zusammengesetzten Teststreifen wandert. Während der Wanderung der Probenflüssigkeit werden spezifische Bindungsreagenzien gelöst und es findet eine Komplexbildung zwischen in der Probe enthaltenem Analyt und spezifischen Bindungsreagenzien statt. Die Komplexe aus Analyt und spezifischen Bindungsreagenzien werden an einer definierten Zone, die bevorzugt als Testlinie ausgebildet ist, durch spezifisches, an dieser Teststelle immobilisiertes Bindungsreagenz abgefangen. Diese abgefangenen Komplexe werden durch die Ansammlung der an die Bindungsreagenzien gekoppelten sichtbaren Partikel, z. B. gefärbtes Polystyrol (Latex), kolloidales Gold usw., sichtbar gemacht. Damit wird der erfindungsgemäße Test auch durchführbar für Nichtfachleute. Außerdem

ermöglicht er eine einfache und hygienische Handhabung. Bei der Durchführung ist bei den besonders bevorzugten Ausführungsformen nur ein Schritt erforderlich, nämlich das Auftragen einer Probe. Das visuell auswertbare Ergebnis ist dann sehr schnell innerhalb weniger Minuten (2-30 Minuten) vorhanden.

In einer anderen Ausführungsform wird der erfindungsgemäße immunchromatographische Schnelltest in der in der WO98/58587 beschriebenen Test-Vorrichtung verwendet. Diese Kombination ermöglicht eine schnelle und einfache Proben-Aufnahme, -Aufbereitung und –Analyse.

Außerdem vermeidet der erfindungsgemäße Schnelltest bei der Analyse von Stuhlproben den bisher vorhandenen Nachteil, daß die im Puffer gelöste Probe einen hohen Gehalt an Feststoffen aufweist, die den Probenfluss durch die feinen porösen Materialien des Teststreifens unterbinden bzw. erschweren.

Darüber hinaus können die Nachteile im Stand der Technik vermieden werden, daß Stuhlproben stark verdünnt werden müssen. Auch müssen bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens die im Bereich von 1:5 bis 1:20 verdünnten Stuhlproben vor dem Test nicht zentrifugiert und von größeren festen Bestandteilen befreit werden. Zusätzlich ermöglicht die vorliegende Erfindung, einen hochsensitiven Test zum Labor-unabhängigen Gebrauch bereitzustellen.

Insbesondere durch die Verlagerung des bevorzugten biotinylierten Rezeptors von der Testlinie in den Auftragbereich wird sowohl eine stark verlängerte Inkubationszeit für die Bindung des Fänger-Antikörpers (zweiter Rezeptor) an das Antigen (Analyt) als auch eine höhere Affinität der Bindung Streptavidin/Biotin im Verhältnis zur Bindung Antikörper/Antigen und damit eine bessere Bindungskinetik an der Testlinie erreicht, obgleich der Teststreifen in seinen Dimensionen nahezu unverändert bleiben kann.

Der Begriff "Säure-resistenter Mikroorganismus" im Sinne dieser Erfindung umfaßt jeden Mikroorganismus, der aufgrund seiner Eigenschaften/Anpassungs-

mechanismen an den Wirt den physikalischen und chemischen Einflüssen des Verdauungstrakts widersteht, so daß er durch einen vorzugsweise immunologischen Nachweis oder unter Verwendung von Aptameren detektierbar ist. Beispiele für derartige Säure-resistente Mikroorganismen sind *Helicobacter pylori, Helicobacter hepaticum, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium pseudotuberculosis und Mycobacterium cansassii.*

Der Begriff "Stuhlprobe des Säugers" bedeutet im Sinne dieser Erfindung jede Stuhlprobe, die für das erfindungsgemäße Nachweisverfahren eingesetzt werden kann. Insbesondere fallen darunter Stuhlproben, die nach an sich bekannten Verfahren für diagnostische Tests aufbereitet worden sind. Die Aufbereitung erfolgt beispielsweise gemäß RIDASCREEN® Entamoeba Enzymimmunoassay (R-Biopharm GmbH, Darmstadt).

"Bedingungen, die eine Komplexbildung erlauben" sind vom Fachmann ohne weiteres einstellbar; s. auch Harlow und Lane, a.a.O., und sind beispielsweise physiologische Bedingungen.

Der Begriff "nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur entspricht" bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß das Epitop eines Antigens nach der Darmpassage von einem Rezeptor, beispielsweise einem monoklonalen Antikörper, Derivat oder Fragment davon oder dem Aptamer erkannt wird, der/das gegen dasselbe Antigen/Epitop gewonnen wurde oder an dieses bindet, welches die Darmpassage nicht passiert hat. Mit anderen Worten, das Epitop/Antigen, das vom o.g. Rezeptor spezifisch gebunden wird, hat die Darmpassage hinsichtlich seiner Struktur unbeschadet oder im wesentlichen unbeschadet überstanden und ist nicht degradiert worden. Als Quelle für die native Struktur des Epitops/Antigens kann z.B. ein mit einer French-Press aufgeschlossener Bakterienextrakt, der mit üblichen Verfahren (vgl. z.B. Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2. Auflage 1989, CSH Press, Cold Spring Harbor, USA) weiter aufgereinigt wurde, oder ein Bakterienlysat, das nach Standardverfahren weiter aufgereinigt wurde (z.B. Sambrook et al., a.a.O.), dienen.

Der Begriff "nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert" bedeutet erfindungsgemäß, daß das vom Rezeptor erkannte Epitop einem Epitop entspricht, das vom Immunsystem eines Säugers, vorzugsweise eines Menschen, präsentiert wird. Die Mechanismen der Antigen-Präsentation sowie Mechanismen, die zur Prozessierung von Antigenen führen und die daraus resultierende Antikörpervielfalt sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in Janeway und Travers, Immunologie, 2. Auflage 1997, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg beschrieben. Diese Epitope können sich von den nativen Epitopen unterscheiden. Der Kontakt des Säugers mit den Mikroorganismen oder den Proteinen oder Fragmenten oder den synthetischen Peptiden kann durch natürliche Infektion (außer bei den synthetischen Peptiden) oder durch Immunisierung erfolgen. Für die Immunisierung können auch Extrakte, Lysate, synthetische Peptide etc. des Mikroorganismus/Proteins herangezogen werden. Geeignete Immunisierungsschemata sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise beschrieben in Harlow und Lane, a.a.O. Geeignete Antikörper können beispielsweise auch durch Immunisierung und/oder Screening auf Surrogate wie synthetische Peptide, rekombinant hergestellte Proteine, Extrakte, Lysate oder partiell verdaute Proteine gewonnen werden.

"Synthetische Peptide" umfassen solche Peptide, die mindestens ein Epitop des nativen oder durch den Darm passagierten Antigens aufweisen. Die Peptide können dabei dieselbe Primärstruktur wie das Antigen oder Fragmente davon aufweisen. Sie können jedoch auch eine andere Primärstruktur (primäre Aminosäuresequenz, z.B. konservative Austausche ) aufweisen.

Der Begriff "spezifisch bindet" bedeutet erfindungsgemäß, daß der Rezeptor keine oder im wesentlichen keine Reaktivität mit anderen Epitopen in Proben nicht infizierter Säuger aufweist. Üblicherweise bindet der Rezeptor nur an ein Epitop eines Antigens, das in der Stuhlprobe auftritt.

Der Begriff "Immunkomplex" umfaßt im Sinne der Erfindung Komplexe, umfassend monoklonale und/oder polyklonale Antikörper.

So kann in dieser Ausführungsform der Erfindung eine aufbereitete Stuhlprobe beispielsweise über einen Fänger-Rezeptor an eine Festphase gebunden werden und das infizierende Agens mit dem in markierter Form vorliegenden Rezeptor nachgewiesen werden. Sofern das nach der Darmpassage vorliegende Antigen (noch) in (homo) di- oder multimerer Form vorliegt, kann der gleiche Rezeptor sowohl als Fänger wie auch als Detektor eingesetzt werden.
Von Bedeutung ist für das erfindungsgemäße Verfahren ferner, daß für einen erfolgreichen Nachweis nur ein Epitop eines antigenen Proteins im wesentlichen konsistent nach der Darmpassage nachweisbar sein muß. Dieses Epitop kann auch mehrmals auf einem Homo-Dimer oder –multimer vorkommen. Die Wahrscheinlichkeit, daß dieses Epitop in nachweisbarer Form vorzufinden ist, ist aber wesentlich höher, als wenn ein Nachweistest auf mehr als einem nachzuweisenden Epitop aufbauen muß.

Schließlich bringt das erfindungsgemäße Verfahren, das nur einen Rezeptor benötigt, Kosten- und Standardisierungsvorteile mit sich.

Basierend auf dem erfindungsgemäßen überraschenden Befund, daß bestimmte Antigene aus den genannten Mikroorganismen nach der Darmpassage eine im wesentlichen konsistent nachweisbare Epitopstruktur aufweisen, muß auch eine zweite Ausführungsform als essentiell für die Erfindung gelten. Diese Ausführungsform beruht darauf, daß verschiedene Rezeptoren an verschiedene Epitope desselben Antigens binden. Der Begriff "im wesentlichen" bedeutet dabei, daß das Epitop / die Epitope und damit eine entsprechende Infektion mit dem Mikroorganismus bei mehr als 60 bis 70%, vorzugsweise mindestens 75%, stärker bevorzugt mehr als 85%, besonders bevorzugt mehr als 90%, noch stärker bevorzugt mehr als 95% und am meisten bevorzugt mehr als 98% der Betroffenen

erfaßt werden kann / können. Idealerweise werden Infektionen bei 100% der Betroffenen nachgewiesen.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, daß mit einem einzigen Rezeptor, der ein Epitop eines Antigens eines Säure-resistenten Mikroorganismus spezifisch bindet, oder zwei Rezeptoren, die zwei Epitope desselben Antigens spezifisch binden, eine relativ sichere Diagnose der Infektion mit diesen Bakterien/Pathogenen durchgeführt werden kann. Die Erfindung schließt Ausführungsformen mit ein, in denen weitere Epitope, die die vorgenannten Eigenschaften aufweisen, von weiteren Rezeptoren, z.B. von monoklonalen Antikörpern oder Fragmenten oder Derivaten davon oder Aptameren erkannt werden. Letztere Ausführungsformen sind dazu geeignet, die Sicherheit bei der Stellung der Diagnose noch weiter zu erhöhen. Diese weiteren Rezeptoren können vorteilhafterweise Antikörper, Fragmente oder Derivate sein, die Urease, vorzugsweise β-Urease, das 26 kDa Protein oder Hsp 60, alle vorzugsweise aus *H. pylori*, spezifisch erkennen. Der Nachweis eines oder mehrerer dieser Proteine/Proteinfragmente kann im selben Test und in einem unabhängigen Test mit einem anderen Teil derselben Probe durchgeführt werden.

Die erfindungsgemäßen Ergebnisse sind vor allem deshalb überraschend, da der Stand der Technik hiervon weggelehrt hatte. So wurde beispielsweise bei *H. pylori* gefunden, daß Hauptantigene in ELISA-Tests nicht die gewünschte Spezifität und Sensitivität aufweisen; vgl. Newell et al., Serodiag. Immunother. Infect. Dis. **3** (1989), 1-6. Darüber hinaus lehrt die EP-A 0 806 667, daß ein sicherer Nachweis von *H. pylori*-Infektionen mit Rezeptoren wie monoklonalen Antikörpern aufgrund der genetischen Variabilität der *H. pylori*-Stämme nicht möglich sei.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist gegenüber dem erwähnten Stand der Technik insbesondere deshalb von Vorteil, da mit lediglich einem Rezeptor eine relativ sichere Diagnose ermöglicht wird. Vorzugsweise werden für den Nachweis, beispielsweise im ELISA oder Schnelltest Paare von Rezeptoren, wie Antikörpern, Fragmenten, Derivaten davon oder Aptameren eingesetzt, wobei die beiden

Rezeptoren des Paares dasselbe oder unterschiedliche Epitope auf demselben Antigen binden. Beispielsweise bildet *H. pylori*-Katalase multimere Strukturen aus mehreren gleichen Untereinheiten aus. Im ELISA, Schnelltest oder anderen Assays können somit die gleichen Rezeptoren als Fängerrezeptoren wie auch als Detektionsrezeptoren eingesetzt werden.

Vorzugsweise kann durch eine Kombination von verschiedenen mAks, die gegen unterschiedliche Epitope der Katalase gerichtet sind oder durch eine Kombination zweier Nachweis-Systeme für verschiedene Antigene (z.B. Katalase/Urease) eine Steigerung von Sensitivität und Spezifität erzielt werden.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist seine Ausgestaltung als direktes und nicht-invasives Verfahren, was die einleitend genannten Annehmlichkeiten für den Patienten sowie die Zuverlässigkeit bei der Bestimmung des Krankheitsstadiums erhöht.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden nachstehend beispielhaft anhand der Figuren dargestellt. Es zeigen:

Fig. 1 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers (HP25.2m/2H10) kodiert.

Fig. 2 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichten Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers (HP25.2m/2H10) kodiert.

Fig. 3 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers (HP25.6m/1B5) kodiert.

Fig. 4 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichten Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers (HP25.6m/1B5) kodiert.

Fig. 5 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichten Kette eines für β-Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers kodiert.

Fig. 6 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines für β-Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers kodiert.

Fig. 7 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichte Kette eines weiteren für β-Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers kodiert.

Fig. 8 Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines weiteren für β-Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers kodiert.
Fig. 9 Aufbau eines bevorzugten Teststreifens gemäß der Erfindung.
Fig. 10 Aufbau eines bevorzugten Teststreifens gemäß der Erfindung mit Kontrollinie.

Der erfindungsgemäße Stuhl-Schnelltest gemäß Fig. 10 besteht aus einem Probenauftrag-Bereich (1, 2), einem Test-Bereich (Testmembran) (3) und einem Absorptionsbereich (4).

In einer bevorzugten Ausführungsform besteht der Probenauftrag-Bereich (1) aus zwei übereinanderliegenden Konjugat-Bereichen. Bevorzugt enthält der obere Konjugat-Bereich bzw. das Konjugat-Vlies den beispielsweise mit Gold markierten spezifischen Rezeptor. Der darunter liegende Konjugatbereich bzw. das Konjugat –Vlies (nicht dargestellt) enthält beispielsweise den Biotin-markierten spezifischen Rezeptor.

Ein guter Probenfluss und eine gleichmäßige Verteilung der Immunreagenzien in der Probensuspension während des Testablaufs sind für die Sensitivität eines immunchromatographischen Schnelltests von großer Bedeutung. Beide Parameter werden vor allem durch die Eigenschaften der verwendeten porösen Materialien, sowie deren Abmessungen und gegenseitigen Anordnung beeinflußt.

Bei Schnelltests zur Untersuchung von Stuhlproben stellt sich zusätzlich die Anforderung, die in der Probenlösung enthaltenen Feststoffe vor dem Übertritt auf die Testmembran effizient abzufiltern.

Der Probenauftrag-Bereich des Tests ist aus einem Konjugatvlies (1) und einem sich anschließenden Filter (2) zusammengesetzt. Durch den Filter werden die Feststoffanteile der Stuhlsuspension, die einen Probenfluss über die Testmembran verhindern würden, abgetrennt. Die Testmembranen, mit denen eine hohe Sensitivität zu ereichen ist, weisen eine Verteilung der Porengrößen im Bereich

zwischen 2 und 20 µm, bevorzugt 5 µm auf. Der Filter weist eine Ausschlussgröße von 1-2 µm auf. Hierzu sind Materialien aus Glasfaser oder Polyester-Glasfaser-Gemischen besonders geeignet. Geeignet sind ebenfalls Gemische aus natürlichen und synthetischen Fasern, die zur Blutseparation entwickelt wurden.

Folgende Filter sind beispielsweise geeignet: Whatman GF/A, GF/B, GF/C, GF/D, F145, F147, F487, GF/DVA; Ahlstrom 111, 141, 142, 151, 164; Pall A/B, A/C, A/D, A/E, A/F. Für das Konjugatvlies eignet sich offenporiges Material aus Glasfaser, Polyester oder Polypropylen wie beispielsweise Whatman F 075-14; Schleicher und Schuell GF 10, GF33, GF 53, Accuflow P, Accuflow G; Ahlstrom 8980, 2033, 2040, 8975; Millipore QR 01, QR 35, QR 51, QR61.

Das Konjugatvlies dient in diesem Aufbau neben seiner Funktion als Konjugat-Trägerschicht als Vorfilter, der grobe Feststoffanteile der suspendierten Stuhlprobe zurückhält, bevor sie auf den Filter treffen. Vorteilhaft ist bei diesem Aufbau weiterhin, dass Probenflüssigkeit und gelöstes Konjugat gemeinsam durch den nachgeschalteten Filter fließen und damit die Inkubationszeit von Analyt bzw. Antigen und Konjugat verlängert ist.

Die Abmessungen von Konjugatvlies, Filter und Testmembran und sowie die Übergänge zwischen den Materialien des Probenauftrag-Bereichs sind so gestaltet, daß eine ausreichende Filterung der Stuhlsuspension erzielt wird.
Während des Probenauftrags darf die Probenflüssigkeit nur in Kontakt mit dem Konjugatvlies, nicht aber mit dem Filter gelangen.
Der erfindungsgemäße Aufbau gewährleistet, daß eine ausreichende Filterfläche in Kontakt zu der durch das Konjugatvlies fließenden Probenflüssigkeit kommen kann. Weiterhin ermöglicht der erfindungsgemäße Aufbau einen Mindestabstand zwischen Konjugatvlies und Testmembran, um ein Übertreten von nicht ausreichend gefilterter Probenflüssigkeit auf die Testmembran auszuschließen.

Die Abmessungen der einzelnen Bereiche bzw. Materialien entsprechen folgenden Angaben:

Die bevorzugte Breite des Teststreifens beträgt zwischen 3 mm und 10 mm, besonders bevorzugt 5 mm. Die bevorzugte Länge des Teststreifens beträgt 50-100 mm, besonders bevorzugt 75 mm . Die bevorzugte Länge des Konjugatvlieses liegt im Bereich von 5-30 mm, besonders bevorzugt bei 25 mm. Die Überlappung von Konjugatvlies und Filter beträgt hierbei bevorzugt zwischen 5 und 15 mm, besonders bevorzugt 10 mm. Bevorzugt sind Filter der Länge zwischen 10 und 20 mm, besonders bevorzugt 15 mm. Die Überlappung zwischen Filter und Testmembran beträgt bevorzugt zwischen 1 und 3 mm, besonders bevorzugt 1 mm.

Die Absorberschicht am Ende des Teststreifens (4) besitzt erfindungsgemäß sowohl eine ausreichende Kapazität zur Aufnahme der durch den Teststreifen gewanderten Probenflüssigkeit, als auch eine relativ feinporige Struktur zur Aufrechterhaltung der Kapillarwirkung. Besonders geeignet dafür erwiesen sich Zellulose-Glasfaser-Materialien wie beispielsweise Whatman 17 CHR, 3 MM, 31 ET, WF1.5, D28, CD 427-05, CD 427-07, CD 427-08; Schleicher & Schuell 2992, GB 003, GB 004; Pall 111, 113, 133, 165, 197; Ahlstrom 320, 222, 238, 237. Besonders bevorzugt ist bei Teststreifen mit einer Breite von 5 mm eine Abmessung von 10-30 mm Länge für den Analysebereich. Die Überlappung von Testmembran auf die Absorberschicht beträgt bevorzugt mindestens 1 mm.

Besonders bevorzugt findet der Schnelltest der Erfindung Verwendung in einer Vorrichtung zur Aufnahme und Untersuchung von Proben, wie sie in der WO 98/58587 (PCT/EP98/03764) beschrieben ist. Der Gegenstand dieser Druckschrift ist durch Bezugnahme in die Beschreibung inkorporiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Säure-resistente Mikroorganismus ein Säure-resistentes Bakterium.

Im Stand der Technik ist eine Reihe von Säure-resistenten Bakterien bekannt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Säure-resistente Bakterium

ein Bakterium der Gattung Helicobacter, Campylobacter oder der Gattung Mycobacterium.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Bakterium ein Bakterium der Spezies *Helicobacter pylori, Helicobacter hepaticum, Campylobacter jejuni* oder ein Bakterium der Spezies *Mycobacterium tuberculosis*.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Rezeptor/sind die Rezeptoren (ein) Antikörper, (ein) Fragment(e) oder (ein) Derivat(e) davon oder (ein) Aptamer(e).

Der Begriff "Rezeptor" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung jedoch auch weitere Bindepartner wie beispielsweise Avidin, Streptavidin oder Polystreptavidin und Biotin.

"Fragmente" oder "Derivate" von monoklonalen Antikörpern weisen im Sinne dieser Erfindung dieselbe Bindungsspezifität wie die monoklonalen Antikörper auf. Derartige Fragmente oder Derivate können nach üblichen Verfahren hergestellt werden; vgl. z.B. Harlow und Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988. Beispiele für Fragmente sind Fab-, $F(ab')_2$ oder Fv-Fragmente. Beispiele für Derivate sind scFv-Fragmente. Derivate können auch chemisch hergestellte Substanzen sein, die dieselben oder verbesserte Bindungseigenschaften wie die Antikörper aufweisen. Solche Substanzen können beispielsweise durch Peptidomimetics oder durch verschiedene Runden von Phage Display und nachfolgende Selektion auf verbesserte Bindungseigenschaften hergestellt werden. Unter Aptameren werden erfindungsgemäß Nukleinsäuren wie RNA, ssDNA (ss = Einzelstrang), modifizierte RNA oder modifizierte ssDNA verstanden, die eine große Vielzahl von Zielsequenzen mit hoher Spezifität und Affinität binden. Der Begriff "Aptamer" ist im Stand der Technik bekannt und definiert beispielsweise in Osborne et al., Curr. Opin. Chem. Biol. **1** (1997), 5-9, oder in Stull und Szoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483 beschrieben.

Der Begriff "Antigen-Antikörperkomplex" im Sinne dieser Erfindung umfaßt nicht nur Komplexe, die das Antigen mit dem nativen Antikörper eingeht, sondern auch solche, die es mit dessen Fragmenten oder Derivaten eingeht.

Umfaßt von der Erfindung sind Ausführungsformen, bei denen nur monoklonale Antikörper oder Fragmente oder Derivate davon oder nur Aptamere eingesetzt werden, wie auch Ausführungsformen, bei denen in einem Test unterschiedliche Arten von Nachweisreagenzien eingesetzt werden. So ist es möglich, daß ein erster monoklonaler Antikörper mit einem zweiten Antikörperderivat oder ein erstes Aptamer mit einem zweiten Antikörperfragment eingesetzt wird, um nur zwei Beispiele zu nennen. Insofern bezeichnen die Begriffe "erste" und "zweite" das erste und zweite Nachweisreagens. Gemeint ist dabei nicht, daß immer zwei Antikörper, Derivate oder Fragmente davon oder immer zwei Aptamere eingesetzt werden.

Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, Fragmenten oder Derivaten davon oder von Aptameren gewährt einen leicht zu haltenden Standard bei der Zuverlässigkeit des Diagnoseverfahrens, was ein großer Vorteil im Vergleich zu bisher bekannten und für diesen Zweck eingeführten Diagnoseverfahren ist. Weiterhin entfällt das beispielsweise im Verfahren der EP-A 0 806 667 notwendige immer neue Immunisieren und nachfolgende Testen von Versuchstieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen das Antigen einer Katalase. Die Katalase hat den besonderen Vorteil, daß sie in allen bisher bekannten Säure-resistenten Bakterien nachgewiesen werden konnte. Erfindungsgemäß konnte als weiterer Vorteil ermittelt werden, daß die Katalase sehr resistent gegen die Verdauung im Darmtrakt ist, was den Nachweis signifikanter Mengen vereinfacht. Schließlich liegt die Katalase oder Fragmente davon auch nach der Darmpassage oft noch höhergeordneter Struktur, z.B. in tetramerer Form vor, was den Nachweis mit nur einem Rezeptortyp erleichtert.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, daß in einer Population von Säugern, insbesondere von menschlichen Patienten, deren Stuhl auf Infektionen mit Säure-resistenten Bakterien getestet wurde, im wesentlichen alle Mitglieder dieser Population konsistent wiederkehrende Katalase-Epitope im Stuhl aufwiesen, so daß mit hoher Wahrscheinlichkeit mit nur einem entsprechenden Rezeptor, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern, Fragmenten oder Derivaten davon oder Aptameren eine relativ sichere Diagnose gestellt werden kann. Insbesondere, da die Katalase eine tetramere antigene Struktur aufweist, kann diese Diagnose vorteilhafterweise beispielsweise im ELISA, immunchromatographischen Schnelltest oder in ähnlich angeordneten Festsystem gestellt werden.

Besonders bevorzugt ist, daß die Katalase die Katalase von *H. pylori* ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen eine Metalloproteinase, besonders bevorzugt die Metalloproteinase aus *H. pylori*.

In einer andern bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen eine Urease, bevorzugt aus *H. pylori*.
In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird für den Nachweis zusätzlich ein Gemisch von Rezeptoren eingesetzt, wobei das Gemisch von Rezeptoren als Fänger des Antigens fungiert, wenn der Rezeptor als Detektor des Antigens eingesetzt wird und das Gemisch als Detektor des Antigens fungiert, wenn der Rezeptor als Fänger des Antigens eingesetzt wird. Für den Nachweis können sowohl unterschiedliche Gemische von Rezeptoren als Fänger und Detektor des Antigens als auch das gleiche Gemisch als Fänger und Detektor des Antigens eingesetzt werden. Beim Einsatz des gleichen Gemischs als Fänger und Detektor des Antigens liegt der Fänger bevorzugt in markierter Form und der Detektor immobilisiert auf der Testlinie vor.

Diese Ausführungsform der Erfindung erlaubt eine besonders sichere Diagnose, insbesondere wenn das Antigen nicht in dimerer oder multimerer Konformation

nach der Darmpassage vorliegt. Diese Ausführungsform erlaubt, daß nur einer der beiden in den meisten standardisierten immunologischen Nachweisverfahren eingesetzten Rezeptortypen ein monoklonaler Antikörper ist, während beispielsweise der zweite Rezeptortyp ein polyklonales Serum sein kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gemisch von Rezeptoren ein polyklonales Antiserum.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden für den Nachweise Gemische von Rezeptoren eingesetzt, wobei ein Gemisch von Rezeptoren als Fänger des Antigens fungiert und ein Gemisch von Rezeptoren als Detektor des Antigens fungiert und vorzugsweise mindestens ein Gemisch ein polyklonales Serum ist.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform fungiert ein Gemisch von Rezeptoren sowohl als Fänger als auch als Detektor des Antigens, wobei vorzugsweise dieses Gemisch ein polyklonales Antiserum ist.

In einer zusätzlich besonders bevorzugten Ausführungsform wurde das polyklonale Antiserum gegen ein Lysat des Mikroorganismus, vorzugsweise *H. pylori,* gewonnen.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Lysat ein Lysat mit angereichertem Antigen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Lysat ein Lysat mit abgereichertem immundominantem Antigen.
Die vorgenannten beiden Ausführungsformen schließen auch ein, daß das Lysat ein Lysat mit angereichertem Antigen, vorzugsweise mit angereicherter Katalase wie auch mit abgereichertem immundominantem Antigen, vorzugsweise hauptantigener Urease ist. Insbesondere die genannte Kombination läßt eine gute und für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignete

Immunisierungsausbeute zu. Eine Art der Durchführung entsprechender Anreicherungs- bzw. Abreicherungsverfahren ist in den Beispielen näher beschrieben.

Gemäß einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wurde das polyklonale Antiserum gegen ein aufgereinigtes oder ein (semi)synthetisch hergestelltes Antigen gewonnen, das bevorzugt ein Katalase-, Metalloproteinase- oder Ureaseenzym, vorzugsweise aus *H. pylori* ist.

Die Rezeptoren, vorzugsweise die monoklonalen Antikörper, Fragmente oder Derivate davon oder die Aptamere können erfindungsgemäß lineare oder Konformationsepitope erkennen und spezifisch binden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bindet mindestens einer der Rezeptoren ein Konformationsepitop.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform binden sämtliche Rezeptoren Konformationsepitope.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.2m/2H10] mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: NYWIH

CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3: EGYDGFDS

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform weist die die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.2m/2H10] kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: AACTACTGGATTCAC

CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT TACAATCAGG ACTTTCAGGA C

CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform weist die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.2m/2H10] mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: SASSSVNYMY

CDR2: DTSKLAS

CDR3 . QQWSSNPYT

Weiterhin weist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.2m/2H10] kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTAAA TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.6m/1B5] mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformweist die die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.6m/1B5] kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: GACACCTATGTGCAC

CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAAACTAAATATGACCCGATATTC CAGGCC

CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform weist die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.6m/1B5] mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: KASQDVGTSVA

CDR2: WTSTRHT

CDR3 . QQYSSSPT

Weiterhin weist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers [HP25.6m/1B5] kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC

CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist der β-Urease-spezifische Antikörper der von einem der bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) am 23. Juni 1998 nach den Statuten des Budapester Vertrages unter den Hinterlegungsnummern DSM ACC2360 oder DSM ACC2362 hinterlegten Hybridomen HP8m/4H5-D4-C9 oder HP9.1m/3C2-F8-E2 produzierte Antikörper. Der in den Figuren beschriebene β-Urease-spezifische Antikörper HP8m/1H5-G2-B4 wird durch einen Tochterklon des hinterlegten Hybridoms HP8m/4H5-D4-C9 produziert. Die beiden durch Mutter- und Tochterklon produzierten Antikörper werden durch identische DNA-Sequenzen kodiert und weisen dieselben Eigenschaften auf.

In dieser anderen besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die schwere Kette des ein Epitop der β-Urease bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPDSLKG

CDR3: DYSWYALDY

oder:

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

In einer weiterhin besonders bevorzugten Ausführungsform weist die die schwere Kette des ein Epitop der ß-Urease bindenden Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

oder:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die leichte Kette des ein Epitop der β-Urease bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs auf:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSESIS

CDR3: QQSNTWPLT

oder:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

Des weiteren weist die die leichte Kette dieses Antikörpers kodierende DNA-Sequenz bevorzugt folgende CDRs auf:

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC

CDR2: TAT GGTTCTGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

oder:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCAACT TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

Besonders bevorzugt ist ferner, daß die schweren und leichten Ketten, die die vorstehend angegebenen CDRs aufweisen, gemeinsam in einem Antikörper, Fragment oder Derivat davon auftreten, der/das Katalase oder der/das ß-Urease oder ein Fragment davon, vorzugsweise aus *H. pylori* spezifisch bindet. Die Erfindung umfaßt jedoch auch Ausführungsformen, in denen diese schweren oder leichten Ketten mit anderen leichten bzw. schweren Ketten kombiniert werden, wobei die Bindungseigenschaften im wesentlichen beibehalten oder verbessert werden können. Entsprechende Verfahren sind im Stand der Technik bekannt. Besonders bevorzugte Antikörper weisen in den variablen Regionen der leichten und schweren Ketten die in den Figuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 bzw. 7 und 8 dargestellten auf bzw. werden die Regionen von den dort dargestellten DNA-Sequenzen kodiert. Die CDRs können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren in verschiedene FRs („framework regions") integriert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden mit der Stuhlprobe vor der Inkubation mit den Antikörpern folgende Schritte durchgeführt: Die Stuhlprobe wird 1:3 bis 1:25, vorzugsweise etwa 1:15 in einem Probenpuffer suspendiert. Derartige Probenpuffer sind im Stand der Technik bekannt. Ein beispielhafter Probenpuffer enthält 150 mM PBS, 0,1% SDS.
In einer bevorzugten Ausführungsform besteht der Probenpuffer aus 150 mM PBS, 0,5% Serum und 2% Detergenz. Hierbei kann das Serum aus Rind, Maus, Ratte, Schwein oder Mensch gewonnen und das Detergenz aus der Gruppe ionischer (bevorzugt Tween 20) oder nicht-ionischer Detergentien (bevorzugt SDS) ausgewählt werden.

In einer anderen Ausführungsform kann der erfindungsgemäße Nachweis auch zur Detektion *von H. pylori* in Magengasen, Atemkondensat, Speichel, Zahnplaque, Schleimhautabstrichen, Biopsien, Vollblut oder Serum eingesetzt werden. Die Gewinnung von Atemgasen kann dadurch erfolgen, daß dem Patienten kalte $CO_2$-haltige Getränke verabreicht werden, die eine Freisetzung von Magengasen in Form von „Rülpsen„ verursachen. Diese Gase können in geeigneten Behältnissen aufgefangen oder entsprechend Atemkondensat in der dem Fachmann bekannter Weise gewonnen werden, beispielsweise mittels einer Vorrrichtung gemäß DE 19718925 oder einer Vorrichtung gemäß DE 19505504. Die so gewonnenen Kondensate können dann in flüssiger Form in den erfindungsgemäßen Test eingebracht werden, wobei sämtliche Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens wie vorstehend beschrieben werden, mit Ausnahme, daß anstelle einer Stuhlprobe eine wie hier beschriebene Probe eingesetzt wird. Zahnplaque und Schleimhautabstriche werden nach entsprechend den im Stand der Technik bekannten Methoden gewonnen und können wie Speichel, Vollblut und Serum in geeigneter Konzentration sowie Modifikation des Resuspendierungspuffers in den erfindungsgemäßen Nachweis eingesetzt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Nachweis der Bildung des mindestens einen Antigen-Rezeptorkomplexes/Antigen-Rezeptor-

/Rezeptorgemischkomplexes in Schritt (b) mittels eines immunchromatographischen Verfahrens.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird im immunologischen Verfahren derselbe Rezeptor zur Bindung an die Festphase wie auch zum Nachweis des Epitops eingesetzt. Während der Fängerrezeptor in unmodifizierter Form an eine Festphase, beispielsweise Nitrocellulose, gebunden werden kann, ist der zur Detektion eingesetzte Rezeptor gegebenenfalls mit einer Markierung versehen.

In einer weiteren Ausführungsform kann der Fängerrezeptor in biotinylierter Form vorliegen und über auf der Festphase immobilisiertes Streptavidin an diese gebunden werden.

Andererseits kann der Fängerrezeptor nicht Biotin-markiert sein und das Epitop des Mikroorganismus, vorzugsweise das bakterielle Epitop, über einen dritten Biotin-markierten Rezeptor nachgewiesen werden, wobei dieser Rezeptor vorzugsweise ein Antikörper, Fragment oder Derivat davon oder ein Aptamer ist, oder ein speziesspezifischer oder Ig-klassenspezifischer Antikörper oder ein entsprechendes Aptamer sein kann. Dieser dritte Biotin-markierte Rezeptor bindet spezifisch den Fängerrezeptor, und der Analyten-Rezeptorkomplex wird an der Testlinie, die in dieser Ausführungsform aus immobilisiertem Streptavidin besteht, über den dritten Biotin-markierten Rezeptor gebunden.

Als Markierung für den zur Detektion eingesetzten Rezeptor können kolloidales Gold, Selen, farbige Polystyrol- bzw. Latexpartikel, Carbonpartikel sowie (dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannte) disperse Farben eingesetzt werden.

Andererseits kann, wie vorstehend erwähnt, der zur Detektion eingesetzte Rezeptor ebenfalls nicht markiert sein und damit das Epitop des Mikroorganismus auch über einen dritten markierten Rezeptor nachgewiesen werden, der gegen

diesen nicht markierten Rezeptor gerichtet ist, wobei dieser Rezeptor vorzugsweise ein Antikörper, Fragment oder Derivat davon oder ein Aptamer ist, daß ein speziesspezifischer oder Ig-klassenspezifischer Antikörper oder ein entsprechendes Aptamer sein kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Markierung kolloidales Gold.

Derartige Markierungen sind im Stand der Technik bekannt; vgl. beispielsweise Harlow und Lane a.a.O. Entsprechendes gilt für Aptamere. Die vorstehend beschriebenen Ausführungsform ist besonders günstig zum Nachweis der Katalase, die ggf. auch nach der Darmpassage noch als Tetramer vorliegt. Selbstverständlich können auch in dieser Ausführungsform Kombinationen von Antikörpern, Fragmenten, Derivaten und Aptameren eingesetzt werden, z.B. Kombinationen von Antikörpern etc., die an unterschiedliche Epitope desselben Antigens binden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der monoklonale Antikörper ein Maus-Antikörper.

Des weiteren sind in einer bevorzugten Ausführungsform die Rezeptoren an einen Träger fixiert.
Die Fixierung der Rezeptoren, vorzugsweise der Antikörper, Fragmente oder Derivate davon oder der Aptamere an einen Träger ist besonders vorteilhaft für die Durchführung von Routinechecks. Die Kombination Antikörper-Träger/Aptamer-Träger läßt sich ferner gut als Testbesteck oder in Kitform verpacken.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Trägermaterial ein poröses Trägermaterial.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Trägermaterial ein Teststreifen.

Zusätzlich besteht in einer bevorzugten Ausführungsform das Trägermaterial aus Zellulose oder einem Zellulosederivat.

Der Säuger, dessen Stuhl, Magengas, Atemkondensat, Speichel, Zahnplaque, Schleimhautabstrich, Biopsie, Vollblut oder Serum mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden kann, kann ein Tier, beispielsweise ein Haustier wie eine Katze oder ein Hund, ein Nutztier, z.B. ein Schwein oder ein sonstiges Tier wie eine Maus, ein Tiger, ein Gerbil oder ein Frettchen sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Säuger ein Mensch.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren ein automatisiertes Verfahren. Ein automatisiertes Verfahren kann beispielsweise mittels eines Roboters durchgeführt werden, wobei der Roboter eine Teil oder sämtliche Verfahrensschritte durchführt. Entsprechende Roboter sind im Stand der Technik bekannt.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung einen monoklonaler Antikörper, ein Fragment oder Derivat davon, der/das eine V-Region aufweist, die eine Kombination der vorstehend dargestellten CDRs aufweist oder der von einem der vorstehend dargestellten Hybridomen produziert wird.

Bevorzugt sind dabei monoklonale Antikörper, Fragmente oder Derivate davon, die mindestens eine der in den Figuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 bzw. 7 und 8 dargestellten V-Regionen aufweisen. Vorzugsweise weisen diese Antikörper zwei der in den Figuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 bzw. 7 und 8 dargestellten V-Regionen auf. Auch ist bevorzugt, daß diese V-Regionen von den in den Figuren 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6 bzw. 7 und 8 dargestellten DNA-Sequenzen kodiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der monoklonale Antikörper, das Fragment oder Derivat davon ein Maus-Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon oder ein chimärer, vorzugsweise ein humanisierter Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon. Das Derivat kann auch ein Fusionsprotein sein. Weiter bevorzugt ist, daß der Antikörper markiert ist, beispielsweise mit einem Kolloid, mit einer Markierung bestehend aus Gold, Selen, Latex, farbigem Polystyrol, Carbonpartikel dem Fachmann bekannten dispersen Farben.
Die Herstellung von chimärisierten, humanisierten und humanen Antikörpern und der anderen Derivate ist im Stand der Technik wohlbekannt (z.B. Vaughan et al.,1998; Orlandi et al., 1989, Harlow und Lane, a.a.O.).

Die Erfindung betrifft auch ein Aptamer, das dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper, das Fragment oder Derivat davon spezifisch bindet. Die Herstellung derartiger Aptamere kann mit im Stand der Technik bekannten Verfahren erfolgen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Epitop, das von einem der vorstehend beschriebenen monoklonalen Antikörper, Fragment oder Derivat davon oder Aptamer spezifisch gebunden wird.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung weitere Antikörper, Derivate oder Fragmente davon, die das erfindungsgemäße Epitop spezifisch binden. Diese Antikörper können beispielsweise monoklonale Antikörper sein, die unter Verwendung des Epitops als Hapten/Bestandteil eines Antigens nach üblichen Verfahren hergestellt werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus eine diagnostische Zusammensetzung enthaltend mindestens einen Rezeptor, bevorzugt mindestens einen monoklonalen Antikörper, Fragmente oder Derivate davon oder Aptamere wie oben stehend definiert, fixiert an ein Trägermaterial.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung eine Testvorrichtung zum Nachweis mindestens eines wie oben stehend definierten Epitops, umfassend (a) mindestens einen Rezeptor, der vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper, Fragmente oder Derivate davon oder ein Aptamer ist wie oben stehend definiert, fixiert an ein Trägermaterial; (b) eine Vorrichtung zur Aufbereitung und Analyse von Stuhlproben; und gegebenenfalls (c) ein Gemisch von Rezeptoren wie oben stehend definiert.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung weiter eine Vorrichtung zur Aufbereitung und Analyse von Stuhlproben wie in WO 98/58587 beschrieben. Diese Vorrichtung beinhaltet die Probenaufnahme, -Aufbereitung und Testeinheit (Teststreifen) in einem Gerät.

Die Erfindung hat ferner zum Gegenstand eine Testvorrichtung enthaltend (a) mindestens einen Rezeptor, vorzugsweise einen monoklonalen Antikörper, Fragmente oder Derivate davon oder ein Aptamer wie oben stehend definiert, wobei der Rezeptor konjugiert ist mit kolloidalem Gold, Polystyrol (Latex) oder anderen farbgebenden Partikeln, deren Größe typischerweise im Bereich zwischen 5nm und 100nm, vorzugsweise zwischen 40nm und 60nm liegt (besonders bevorzugt ist die Partikelgröße von 40nm bis 60nm für Gold und eine Partikelgröße von 200nm und 500nm für Latex); (b) eine Vorrichtung zur Aufbereitung und Analyse von Stuhlproben, wie beispielsweise in WO 98/58587 beschrieben; und gegebenenfalls (c) ein Gemisch von Rezeptoren wie oben stehend definiert.

Alternativ zu Vorrichtungen zur Aufbereitung und Analyse von Stuhlproben können die Zusammensetzungen und Kits auch Vorrichtungen zur Aufbereitung (sofern erforderlich) und Analyse von Magengasen, Atemkondensat, Speichel, Zahnplaque, Schleimhautabstrichen, Biopsien, Vollblut oder Serum aufweisen.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit enthaltend (a) mindestens einen Rezeptor, der vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper,

Fragmente oder Derivate davon oder ein Aptamer wie oben stehend definiert ist, fixiert an ein Trägermaterial; gegebenenfalls ferner (b) eine Vorrichtung zur Aufbereitung und Analyse von Stuhlproben wie beispielsweise in WO 98/58587 beschrieben; und gegebenenfalls (c) ein Gemisch von Rezeptoren wie oben stehend definiert.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers [HP25.2m/2H10] kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Fig. 2: Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichten Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers [HP25.2m/2H10] kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Fig. 3: Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der schweren Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers [HP25.6m/1B5] kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Fig. 4: Klonierte DNA-Sequenz, die für die V-Region der leichten Kette eines für Katalase spezifischen monoklonalen Antikörpers [HP25.6m/1B5] kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

Fig. 5: DNA-Sequenz, die für eine leichte Kette eines ersten für Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers (DMS ACC2360) kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code ebenfalls dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Einrahmung hervorgehoben.

Fig. 6: DNA-Sequenz, die für eine schwere Kette eines ersten für Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers (DMS ACC2360) kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code ebenfalls dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Einrahmung hervorgehoben.

Fig. 7: DNA-Sequenz, die für eine leichte Kette eines zweiten für Urease spezifischen monoklonalen (DMS ACC2362) kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code ebenfalls dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Einrahmung hervorgehoben.

Fig. 8: DNA-Sequenz, die für eine schwere Kette eines zweiten für Urease spezifischen monoklonalen Antikörpers (DMS ACC2362) kodiert. Die kodierte Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code ebenfalls dargestellt. Die nach Kabat et al. bestimmten CDR-Regionen 1-3 sind durch Einrahmung hervorgehoben.

Fig. 9: Allgemeiner Aufbau des Schnellteststreifens: Probenauftrag-Bereich (1); Test- bzw. Analysebereich (3) und Absorptionsbereich (4). Im Probenauftrag-Bereich befinden sich in getrocknetem Zustand die für den Nachweis erforderlichen Rezeptoren wie beispielsweise spezifische Antikörper für den Analyten bzw. das Antigen, die mit sichtbar farbigen Partikeln, z.B. kolloidalem Gold oder Polystyrol (Latex), markiert sind, oder andere Bindepartner. Der

Testträger besteht meist aus einer speziellen Testmembran wie z.B. Nitrocellulose. Auf dieser Testmembran sind weitere spezifische Rezeptoren, die gegen den Analyten bzw. das Antigen gerichtet sind, als Testlinie immobilisiert. Zwischen Probenauftrage-Bereich und Testbereich befindet sich ein Filter (2).

Fig. 10: Aufbau des Schnellteststreifens mit Kontrollinie: Probenauftrag-Bereich (1); Test- bzw. Analysebereich (3) und Absorptionsbereich (4). Im Probenauftrag-Bereich befinden sich in getrocknetem Zustand die für den Nachweis erforderlichen Rezeptoren für das Antigen, die mit sichtbar farbigen Partikeln, z.B. kolloidalem Gold oder Polystyrol, markiert sind. Der Probenauftrag-Bereich kann in einer bevorzugten Ausführungsform aus zwei übereinanderliegenden Konjugatbereichen bestehen, die in einem Bereich den beispielsweise Gold-markierten Rezeptor, in dem anderen einen Biotin-markierten Rezeptor enthalten. Der Testträger besteht meist aus einer speziellen Testmembran wie z.B. Nitrocellulose. Auf dieser Testmembran sind weitere spezifische Rezeptoren, die gegen den Analyten (Antigen) gerichtet sind, als Testlinie (6) immobilisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform kann als Testlinie Streptavidin immobiliisiert sein. Als Funktionskontrolle kann auf der Testmembran eine weitere Kontroll- oder Abfanglinie (7), beispielsweise ein gegen den markierten Rezeptor gerichteter Rezeptor, immobilisiert sein. Zwischen Probenauftrage-Bereich und Testträger befindet sich ein Filter (2).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1: Isolierung von *H. pylori* Antigenen**

**1.1 Kultivierung von *H. pylori***

*H. pylori* (Stamm NCTC 11637) wurde in Petri-Schalen auf Wilkins-chalkern Agar unter Zusatz von 10% Pferdeblut sowie Amphotericin B, Vancomycin und Cefsoludin (Sigma Chemicals) ausgestrichen und 1-2 Tage unter mikroaerophiler Atmosphäre (Anaerocult GasPAk, Merck) bei 37°C inkubiert. Der Inhalt von 2

Schalen wurde in 350 ml BHIB-Medium unter Antibiotika-Zusatz wie oben in einer 1 l Flasche (Schott) suspendiert, das Medium für 4-8 min mit einem Gasgemisch aus 10% $CO_2$, 5% $O_2$, 85% $N_2$ begast und die Flasche verschlossen. Die Kultur wurde 2 Tage bei 37 °C auf einem Rundschüttler geschüttelt. Der Inhalt der Flasche wurde anschließend steril in eine 10 l Flasche überführt und mit 4,7 l BHIB-Medium aufgefüllt. Die Flasche wurde dann weitere 2 Tage bei 37°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Das gesamte Volumen wurde daraufhin bei 5000 g für 15 min zentrifugiert, Überstand dekantiert und das Bakterienpellet gewogen. Zur Lagerung wurde das Pellet in einer physiologischen Kochsalzlösung unter Zusatz von 15% Glycerin im Verhältnis 2:1 (w/v) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Um die Identität der kultivierten Bakterien zu überprüfen wurde eine mikroskopische Inspektion der Bakterien sowie Tests auf Urease-, Oxidase und Katalase-Aktivität durchgeführt.

**Beispiel 2: Präparation von *H. pylori* Antigenen**

**Präparation von *H. pylori*-Lysat**

*H. pylori* Bakterienpellet (Beispiel 1) wurde 1:10 mit PBS, pH 7,5 versetzt und auf Eis resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden auf Eis mit der kleinen Sonde eines Ultraschallgerätes (Sonifier, Branson), bei 25-30% Intensität 10 x 60 s mit jeweils 60 s Pause beschallt. Die aufgeschlossenen Bakterienzellen wurden 2 x 20 min, bei 4°C und 10 000 rpm zentrifugiert (Sorvall, SS-34). Der Überstand wurde als Antigenpräparation für die Produktion von polyklonalen Antiseren verwendet.

**Präparation von *H. pylori* Katalase**

Gefrorenes Bakterienpellet wurde im Verhältnis 1:2 (w/v) mit Aufschlußpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Flourid (PMSF), 0,05% Natriumazid und 10% (v/v) Isobutanol) versetzt und bei Raumtemperatur (RT) auf einem Über-Kopf-Mischer bis zum vollständigen Auftauen und zusätzlich weitere ca. 15 min geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 20 000 RPM (Sorvall

SS34), 4°C für 20 min, wurde der Überstand abdekantiert und über ein 0,45 µm Filter filtriert.

Der klare Überstand wurde im Verhältnis 1:3 mit Puffer A (20 mM Tris HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,05% Natriumazid) verdünnt und auf eine mit Puffer A äquilibrierte SourceQ-Säule (16/10) (Pharmacia) überführt. Der Durchlauf von der SourceQ-Säule enthielt das Enzym Katalase und war frei von *H. pylori* Hauptantigenen wie Urease, HSP60 und Alkylhydroperoxid-Reduktase.
Zur Isolierung der Katalase wurde der Durchlauf von der SourceQ-Säule einer Molekularsieb-Chromatographie (Superdex 200) (16/60) unterzogen. Die Katalase wurde dabei zusammen mit einem andern ca. 150 kDa großen Protein (Neutrophil Activating Protein, NAP) in etwa gleichen Anteilen isoliert.
In höherer Reinheit wurde Katalase erhalten, wenn der Durchlauf von der SourceQ-Säule mit einer 2 M Natriumacetat-Lösung, pH 4.9 auf 40 mM Natriumacetat gebracht und auf eine SourceS-Säule (8/28) überführt wurde. Nach einem Waschschritt mit Puffer A zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurde die Katalase mit Puffer B (40 mM Natriumacetat, 1 M NaCl, pH 4.9) unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten (Puffer A plus 0% bis 100% Puffer B) eluiert. Katalase eluiert bei ca. 370 mM NaCl.

**Beispiel 3: Charakterisierung der Katalase:**

Das gereinigte Protein wies unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa und eine Reinheit von ≥ 90% auf.

Zur Identifizierung des isolierten Proteins wurde eine Mikrosequenzierung durchgeführt. Das Protein wurde im SDS-PAGE Gel mit LysC Protease gespalten. Das extrahierte Proteingemisch wurde über RP-HPLC aufgetrennt. Die Sequenzanalyse des LysC Peptides ergab folgende Aminosäure-Sequenz:

**ERLHDTIGESLAHVTHK**

Diese Sequenz ist identisch mit dem entsprechenden LysC-Peptid aus *H. pylori* Katalase (Manos J. et al. (1998) Helicobacter 3 (1), 28-38; Genbank Accession No AAC16068.1)

**Beispiel 4: Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper (pAk; mAk)**

**Herstellung polyklonaler Antiseren:**

Polyklonale Antiseren gegen *H. pylori*-Lysat, *H. pylori*-Lysat mit abgereicherten Hauptantigenen wie beispielsweise Urease, HSP60 und Alkylhydroperoxid-Reduktase (siehe Beispiel 2: Isolierung und Reinigung), *H. pylori*-Lysat mit angereicherter Katalase (beispielsweise durch Zufügen von Katalase zum Lysat) sowie polyklonale Antiseren gegen gereinigte Katalase können durch Immunisierung eines ausgewählten Säugetieres (z.B. Maus, Kaninchen, Ziege, etc.) mit den entsprechenden Katalase-Epitope enthaltenden immunogenen Präparationen erhalten werden.

Die Antikörper können mittels Protein A Affinitäts-Chromatographie aus Seren gereinigt und als Fang-Antikörper im Sandwich-ELISA (siehe Beispiel 8) zur Beurteilung der Eignung monoklonaler Antikörper für die Antigen-Detektion in Patientenstuhl eingesetzt werden.

Polyklonale Kaninchen-Antiseren wurden von pab Productions (Herbertshausen) aus *H. pylori*-Lysat hergestellt. Aus diesen Antiseren wurden mittels Protein A Affinitäts-Chromatographie polyklonale Antikörper aufgereinigt und als Fang-Antikörper im Sandwich-ELISA (siehe Beispiel 8) zur Beurteilung der Eignung monklonaler Antikörper für den Nachweis von *H. pylori*-Antigenen in Patientenstuhl verwendet.

**Herstellung monoklonaler Antikörper:**

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgte nach dem Fachmann bekannten Methoden (Harlow & Lane, 1988; Peters & Baumgarten, 1990).

**Immunisierung**

Aus *H. pylori*-Lysat hergestellte Antigenpräparationen (siehe Beispiel 2), wurden zur Immunisierung von Mäusen (BALB/c x C57/Black, F1-Generation, 8-12 Wochen alt) verwendet. Als Grundimmunisierung wurden 50 µg Antigen 1:1 mit komplettem Freundschem Adjuvans (Difco) emulgiert und intraperitoneal injiziert (200 µl/Maus). Bei 4 monatlichen Auffrischungen erhielten die Mäuse jeweils 25 µg Antigen mit inkomplettem Freundschem Adjuvans. Aus retroorbital entnommenem Blut wurde Antiserum als Positivkontrolle im ELISA (siehe Fusionsscreening) gewonnen.

**Fusion**

Zwei Tage nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen die Milzen entnommen und die Milzzellen mit den Myelomzellen P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580; Kearney et al., 1979) im Verhältnis 5:1 mit Polyethylenglykol 4000 fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden in HAT-Medium (Klonierungsmedium (= RPMI 1640 Medium, 20% FCS, 200 U/ml rhIL-6) mit Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Supplement (Sigma)) suspendiert und mit einer Zelldichte von 2-6 x $10^4$ Zellen/Napf in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausplattiert. Die Kultivierung der Hybridome erfolgte bei 37°C, 5% $CO_2$ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

**Fusionsscreening mittels direktem ELISA**

Das Screening der antikörperhaltigen Kulturüberstände aus bewachsenen Näpfen (ca. 10 Tage nach der Fusion) erfolgte im direkten ELISA auf 96-Napf Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc):

Die ELISA-Platten wurden mit 2 µg/ml Immunisierungsantigen in Carbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet (100 µl/Napf, über Nacht, 5°C). Die Beschichtungslösung wurde abgesaugt und noch freie Bindungstellen mit 2% Magermilchpulver in PBS (w/v) geblockt (200 µl/Napf 1 h, Raumtemperatur). Nach zweimaligem Waschen der Platte mit PBS pH 7,3 mit 0,025% Tween-20 (v/v) wurden die Kulturüberstände der Primärklone unverdünnt in die Näpfe pipettiert (100 µl/Napf) und die Platten 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Antiserum, als Negativkontrolle Medium verwendet. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus Ig-POD (DAKO) in PBS mit 0,1% Rinderserumalbumin, 20 min, Raumtemperatur). Nach viermaligem Waschen der Platte wurde Substratlösung (K-Blue, Neogen oder Zitronensäurepuffer, pH 4,5 mit TMB + $H_2O_2$) zugegeben. Die Peroxidase setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma) zu einem farbigen Komplex um. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N Schwefelsäure abgestoppt. Kulturüberstände von Klonen, die antigenspezifische Antikörper produzieren, zeigten eine deutliche Färbung gegenüber den farblosen negativen Kulturüberständen.

**Etablierung und Kultivierung der Hybridome**

Positive Klone wurden zweimal nach dem Prinzip der Grenzverdünnung rekloniert, um Monoklone zu erhalten (Coller & Coller, 1983). Die erste Reklonierung erfolgte in Klonierungsmedium mit Hypoxanthin-Thymidin-Supplement (Sigma), die zweite in Klonierungsmedium. Die Reklone wurden wiederum mittels direktem ELISA auf ihre Antigenspezifität überprüft. Der reklonierte Klon wurde schließlich in Flachflaschen an Produktionsmedium (RPMI 1640 Medium mit 5% IgG-reduziertem FCS) adaptiert. Die Zellen wurden kryokonserviert und Kulturüberstand für die Antikörperreinigung produziert.

## Beispiel 5: Charakterisierung der Antikörper aus Kulturüberstand

Aus einem Repertoire von 30 spezifischen (gegen das Immunisierungs-Antigen Antikörper-produzierenden) Klonen wurden 10 anhand guter Reaktivität auf Stuhlproben *H. pylori*-infizierter Patienten im Sandwich-ELISA ausgewählt (siehe Beispiel 6)

### Isotypbestimmung

Bei den etablierten Klonen wurde im Kulturüberstand eine Isotypbestimmung des monoklonalen Antikörpers mit dem Isotyping Kit IsoStrip (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dies ergab 8 Klone des Typs IgG1 und einen Klon des Typs IgG2a (siehe Tabelle 2).

### Westernblot

Die Kulturüberstände wurden im Westernblot auf die Fähigkeit überprüft, das Immunisierungs-Antigen spezifisch zu erkennen. Pro Gel wurden 15 µg gereinigtes Antigen in reduzierendem Probenpuffer (Laemmli, 1970) gekocht und auf ein 12%iges SDS-Poplyacrylamid-Minigel (8,6 cm x 7,7 cm x 0,1 cm, Biometra) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung bei 25-30 mA wurden die Proteine (Antigen) mittels Semidry-Blot-Verfahren auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert.

Die Membran wurde mit 2% Magermilchpulver in PBS geblockt (30 min, Raumtemperatur) und dreimal 5 min mit TBS/Tween-20 (0,2%) gewaschen. Für den folgenden Inkubationsschritt wurde die Membran in eine Accutran Cross-Blot-Screening-Einheit (Schleicher und Schuell) eingespannt, unter Verwendung einer Gitterplatte mit 34 Querkanälen. In jede der entstandenen Spuren wurden 250 µl TBS/Tween-20 vorgelegt und je 250 µl der zu testenden Hybridomakulturüberstände zugegeben. Die Inkubation erfolgte 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln.

Nach dreimaligem Waschen TBS/Tween-20 wurde die Membran 1 h mit dem POD-konjugierten Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus Ig-POD, DAKO) inkubiert. Die Membran wurde dreimal gewaschen und der Immunkomplex durch Zugabe der 3,3-Diaminobenzidine-Substratlösung (DAB, Sigma) visualisiert. Die antikörperbindenden Proteinbanden wurden anschließend durch ein unlösliches Peroxidasesubstrat sichtbar gemacht.

6 Hybridomakulturüberstände zeigten eine der Katalase entsprechende Bande (58 kDa), 3 Überstände waren im Westernblot negativ, zeigten jedoch eine positive Reaktion mit nativem Antigen im ELISA. Wahrscheinlich erkennen sie ein Konformationsepitop. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Beispiel 6: Screening von mAk Kulturüberständen auf Patientenproben (gemischtes polyklonales / monoklonales System)**

Diejenigen monoklonalen Antikörper, die im Fusionsscreening mittels direktem ELISA positive Antigen-Erkennung zeigten, wurden als Kulturüberstände im Sandwich-ELISA hinsichtlich ihrer Patienten-Erkennung und Antigen-Nachweisgrenze untersucht.

Als interne Entwicklungsproben standen Stuhlproben zur Verfügung, deren Infektionsstatus (Gruppe 0 und 4) mittels histologischer Untersuchung und/oder $^{13}$C-Harnstoff Atemtest erhoben wurde. Bei Patienten der Gruppe 0 konnte eine Infektion mit *H. pylori* sicher ausgeschlossen werden, bei Patienten der Gruppe 4 eine Infektion sicher nachgewiesen werden.

Die Beschichtung der ELISA-Platten (MaxiSorb; Nunc) erfolgte über Nacht bei 5°C mit 100 µl einer Lösung eines polyklonalen Kaninchen-anti-Katalase-Antikörpers oder polyklonalen Kaninchen-anti-*H. pylori*-Antikörpers (pAk; ca. 20 µg IgG/ml 0,1 M Carbonat-Puffer, pH 9,5). Zur Absättigung der noch freien Bindungsstellen wurden 200 µl 150 mM PBS pH 7,2 mit 0,2% Fischgelatine (w/v) pro Napf zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die ELISA-Platte 2 x mit 250 µl PBS unter Zusatz von 0,025% Tween-20 (Waschpuffer 1) gewaschen. Humanstuhl wurde im Verhältnis 1:10 (w/v) mit 150 mM PBS unter Zugabe von 2% Magermilchpulver und 1 mM EDTA suspendiert.

Zur Bestimmung der Antigen-Nachweisgrenze wurde eine *H. pylori* negative Stuhlsuspension mit 50 ng/ml Katalase (siehe Beispiel 2) versetzt und in 1:2 Schritten mit einer *H. pylori* negativen Stuhlsuspension verdünnt. Je 100 µl der Stuhlsuspension wurden pro Napf für eine Stunde inkubiert (Doppelbestimmung bei Patientenproben). Die Platte wurden 4 x mit Waschpuffer 2 (PBS mit 0,2% Tween-20) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Kulturüberstand von Hybridomen (1:5 in PBS verdünnt) zugegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Zugabe eines konjugierten Sekundärantikörpers (Kaninchen-anti-Maus IgG-POD, DAKO, Kopenhagen, Dänemark). Die Peroxidase (POD) setzt das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma) in ein blaues Produkt um. Nach 5 bis 10 Minuten, oder sobald auch die Negativkontrolle eine leichte Blaufärbung zeigte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1N Schwefelsäure (100 µl/Napf) gestoppt. Die Stärke der Farbreaktion wurde im ELISA-Reader (MWG Spektral) gemessen. Die Messung erfolgte bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm. Vor Zugabe des Detektionsantikörpers bzw. der Substratlösung wurde die ELISA-Platte jeweils 3-4 x mit Waschpuffer 1 gewaschen.
Die niedrigste Konzentration, bei der noch eine Extinktion größer oder gleich dem zweifachen der Kontrolle (*H. pylori* negative Stuhlprobe ohne Antigen-Zumischung) detektiert wurde, wurde als Nachweisgrenze festgesetzt.

**Tabelle 1:** HP25.2m/2H10: Sensitivität und Spezifität im Sandwich-ELISA mit Patientenproben

| **Stuhlprobe** | **Infektions-Status des Patienten** | **Fänger-AK: pAk gegen HP Detektions-AK: HP25.2m/2H10 (Kulturüberstand) $OD_{450-620}$** | **Auswertung cut off: 0,1: $OD_{450-620}$= 0,1** |
|---|---|---|---|
| CX0010 | POSITIV | 0,25 | positiv |
| CX1014 | POSITIV | 0,75 | positiv |
| CX1029 | POSITIV | 0,18 | positiv |
| CX1038 | POSITIV | 0,09 | negativ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| CX1052 | POSITIV | 0,11 | positiv |
| CX2008 | POSITIV | 0,63 | positiv |
| CX2009 | POSITIV | 0,32 | positiv |
| CX2016 | POSITIV | 0,07 | negativ |
| CX2019 | POSITIV | 0,59 | positiv |
| CX2029 | POSITIV | 0,52 | positiv |
| CX0213 | POSITIV | 0,04 | negativ |
| CX294-1 | POSITIV | 0,14 | positiv |
| CX3098 | POSITIV | 0,13 | positiv |
| CX3146 | POSITIV | 0,05 | negativ |
| CX3148 | POSITIV | 0,08 | negativ |
| CX3234 | POSITIV | 0,18 | positiv |
| CX4003 | POSITIV | 0,17 | positiv |
| CX4006 | POSITIV | 0,25 | positiv |
| CXT001 | POSITIV | 0,23 | positiv |
| CXT002 | POSITIV | 0,53 | positiv |
| CXT003 | POSITIV | 0,12 | positiv |
| CXT004 | POSITIV | 0,03 | negativ |
| CXT005 | POSITIV | 0,03 | negativ |
| CXT006 | POSITIV | 0,31 | positiv |
| CXT007 | POSITIV | 0,08 | negativ |
| CX1008 | NEGATIV | 0,29 | positiv |
| CX1031 | NEGATIV | 0,08 | negativ |
| CX1049 | NEGATIV | 0,7 | positiv |
| CX1051 | NEGATIV | 0,09 | negativ |
| CX0142 | NEGATIV | 0,03 | negativ |
| CX0185 | NEGATIV | 0,03 | negativ |
| CX0189 | NEGATIV | 0,08 | negativ |
| CX0193 | NEGATIV | 0,03 | negativ |
| CX2010 | NEGATIV | 0,08 | negativ |
| CX2018 | NEGATIV | 0,09 | negativ |
| CX0220 | NEGATIV | 0,03 | negativ |
| CX0231 | NEGATIV | 0,03 | negativ |
| CX0258 | NEGATIV | 0,02 | negativ |
| CX3008 | NEGATIV | 0,09 | positiv |
| CX3011 | NEGATIV | 0,08 | negativ |
| CX3033 | NEGATIV | 0,07 | negativ |
| CX3035 | NEGATIV | 0,09 | negativ |

AK: Antikörper; HP: *H. pylori*; pAK polyklonaler Antikörper

Der monoklonale Antikörper HP25.2m/2H10 zeigte im Sandwich-ELISA mit Patientenproben eine Sensitivität von 68% (von 25 positiven Proben wurden 17 richtig erkannt) und eine Spezifität von 82% (von 17 Proben wurden 14 richtig erkannt).

**Tabelle 2:** Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Katalase

| **Fusion/Klon** | **Isotyp** | **WB (Ag)** | **NWG (ng/ml)** | **Stuhlproben, die korrekt erkannt wurden** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | pos. Proben | neg. Proben |
| HP25.2m/2H10 | IgG2a, κ | + | 1,5 | 17 von 25 | 14 von 17 |
| HP25.6m/1G4 | IgG1, κ | + | 1,5 | 4 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/1B5 | IgG1, κ | + | 3-6 | 3 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/1H4 | IgG1, κ | + | 3-6 | 2 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/4E3 | IgG1, κ | + | 6 | 2 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/1A5 | IgG1, κ | + | 6 | 2 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/5E4 | IgG1, κ | - | 1,5 | 1 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/4A12 | IgG1, κ | - | 1,5 | 1 von 5 | 2 von 2 |
| HP25.6m/5F4 | IgG1, κ | - | 1,5 | 1 von 5 | 2 von 2 |

Ag: Antigen; WB: Westernblot; NWG: Nachweisgrenze

**Ergebnisse**

Tabelle 2 faßt die Ergebnisse der Isotyp-Bestimmung, der Westernblot-Analysen, der Nachweisgrenzen-Bestimmung und der Patienten-Erkennung für die monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand gegen Katalase zusammen. Im gemischt polyklonal-monoklonalen Sandwich-ELISA-System zeigt der mAk HP25.2m/2H10 eine Sensitivität von 68% und eine Spezifität von 82%. Eine Verbesserung von Sensitivität und Spezifität zeigte sich durch den Einsatz von

gereinigten mAk (statt Kulturüberstand) in einem rein monoklonalen ELISA-System.

Dabei können entweder ein monoklonaler Antikörper, der gegen das gleiche Epitop des Antigens gerichtet ist, oder zwei verschiedene monoklonale Antikörper die gegen verschiedene Epitope des gleichen Antigens gerichtet sind (siehe Beispiel 8), als Fänger- und Detektor-Antikörper eingesetzt werden.

**Beispiel 7: Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridomakulturüberständen**

Die Reinigung von mAk aus serumfreien Hybridomakulturüberständen erfolgt mittels einer modifizierten Protein-G Affinitätschromatographie (Pharmacia Biotech, 1994).
Die filtrierten (0,45 µm) Kulturüberstände wurden direkt über eine Protein G Matrix geleitet. Der Proteinnachweis im Durchlauf bzw. Eluat erfolgte über die Messung der optische Dichte bei 280 nm. Nach einem Waschschritt mit 150 mM PBS, pH 7,2 bis zum Erreichen des Detektor-Hintergrundwertes wurde mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 3,3 eluiert. Die Regeneration der Protein G Matrix erfolgte mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,7.

**Beispiel 8: Charakterisierung der gereinigten monoklonalen Antikörper und Antikörperauswahl für den Test**

Diejenigen Antikörper, welche die besten Detektionseigenschaften bei der Stuhlprobenerkennung in der Messung aus dem Kulturüberstand zeigten, wurden im gereinigten Zustand weiter charakterisiert. Zum einen wurden mittels Oberflächen-Plasmonresonanz die Affinitätskonstanten bestimmt. Des weiteren wurden die Bindungsregionen der Antikörper kartiert (Epitop Kartierung). Schließlich erfolgte eine Auswahl geeigneter Antikörper-Paare an Hand von Stuhlproben im Sandwich-Stuhl-ELISA und im Schnelltest.

**Charakterisierung von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie)**

Mit der SPR-Spektroskopie können die Affinitätskonstanten der monoklonalen Antikörper bestimmt werden. Dadurch lassen sich geeignete Antikörper für die Entwicklung von ELISA und Schnelltest finden.

**Durchführung der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie am Pharmacia BIAcore**

Alle Schritte wurden auf einer Pharmacia BIAcore Processing Unit CA 186 nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt (BIAcore Methods Manual).
Katalase wurde dabei über Aminkopplung auf der Dextranmatrix des BIAcore CM5 Sensorchips immobilisiert. Zur Aktivierung der Dextranmatrix wurden 45 µl einer 1:1-Mischung aus 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 0,2 M 1-Ethy-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)-Lösung bei einer Flußrate von 5 µl/min über den Sensorchip geleitet. Anschließend wurde Katalase (35 µl; 50 µg/ml in 10 mM Natrium-Acetat pH 5,0) an die Dextranmatrix gebunden. Verbleibende NHS-Ester wurden mit 1 M Ethanolamin (35 µl) deaktiviert. Nicht-kovalent an die Dextranmatrix gebundene Katalase wurde durch Regeneration des Sensorchips mit HCl (10 mM; 15 µl) entfernt.

Durch Zugabe der Katalase-spezifischen monoklonalen Antikörper wurden diese mit immobilisierter Katalase zur Reaktion gebracht und die Massenanlagerung am Detektor gemessen. Es wurden Antikörper-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Bereich zwischen 20 und 670 nM eingesetzt. Diese wurden mit einer Flußrate von jeweils 25 µl/min über die auf dem Sensorchip CM5 immobilsierte Katalase injiziert.

Aus dem zeitlichen Verlauf des Resonanzsignals lassen sich die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption ($k_{on}$) und Desorption ($k_{off}$) des

Antikörpers errechnen (BIAevaluation software 3.0). Von den 6 monoklonalen Antikörpern, die getestet wurden, zeigten 4 sehr gute Affinitäten $K_D$>5E-10 (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Ergebnisse der Affinitätsbestimmung der monoklonalen Antikörper gegen Katalase

| mAk | $k_{on}$ [$M^{-1}$ $s^{-1}$] | $k_{off}$ [$s^{-1}$] | $K_D$ [M] |
|---|---|---|---|
| HP25.2m/2H10 | 1,44E+05 | 3,90E-05 | 2,71E-10 |
| HP25.6m/1G4 | 1,41E+05 | 2,52E-05 | 1,79E-10 |
| HP25.6m/1B5 | 5,67E+04 | 3,86E-05 | 6,81E-10 |
| HP25.6m/1H4 | 7,12E+04 | 4,12E-05 | 5,79E-10 |
| HP25.6m/4E3 | 4,92E+04 | 5,96E-05 | 1,21E-09 |
| HP25.6m/1A5 | 3,91E+04 | 4,77E-05 | 1,22E-09 |

$K_D = k_{off} : k_{on}$

**Epitop-Kartierung der monoklonalen Antikörper gegen Katalase**

Die Epitop-Kartierung wurde von der Firma Pepscan Systems (Niederlande) durchgeführt. Es wurde eine Peptid-Bank (30-mere mit einer Überlappung von 27 Aminosäuren) der Katalase auf Plastikkarten hergestellt und mit den Antikörpern inkubiert. Die ermittelten Epitope (Peptide, an die Antikörper gebunden haben) sind in Tab. 4 aufgeführt. HP25.2m/2H10 zeigte unspezifische Peptiderkennung, d.h., daß dieser Antikörper sehr wahrscheinlich an ein diskontinuierliches Strukturepitop bindet. Auch HP25.6m/1B5 zeigte neben der Haupterkennungsregion (siehe Tab. 4) weitere unspezifische Peptidbindungen, die die Mitwirkung einer Strukturkomponente erwarten lassen. Überträgt man die ermittelten Epitope auf die Struktur der E. coli Katalase (Bravo et al., 1999), so fällt auf, daß die Antikörper HP25.6m/1B5, 1A5 4E3, 1G4 und 1H4 im Enzymzentrum

(Aminosäure 190 - 360) binden, einem Bereich, der in der Nähe der katalytischen Domäne liegt.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Epitop Kartierung der Katalase-mAk

| **mAk** | **erkanntes Epitop** |
|---|---|
| HP25.2m/2H10 | diskontinuierlich |
| HP25.6m/1B5 | EGNWDLVGNNTPVFFIRDAIKFPDFIHTQKRDPQTN |
| HP25.6m/4E3 | IARGDYPKWLSTQVMPEEDAKKYRFHPFDVTK |
| HP25.6m/1A5 | IARGDYPKWLSTQVMPEEDAKKYRFHPFDVTK |
| HP25.6m/1H4 | SRGDYMQNGYYGSLQNYTPSSLPGYKEDKS |
| HP25.6m/1G4 | 1. EEAAEIRKHDPDSNQRDLFDAIARGDYPKW<br><br>2. DDSDYYTQPGDYYRSLPADEKERLHDT<br>ERLHDTIGESLAHYTHKAEIVDKQLEHFKKA |

Überlappende Erkennungsregionen der Antikörper sind unterstrichen.

**Ermittlung von geeigneten Antikörperpaaren an Hand von Patientenstuhl**

Die Antikörper gegen Katalase wurden zunächst gegeneinander austitriert. Dann wurden mit den so optimierten ELISA-Systemen Patientenstuhlproben getestet, sowie die Nachweisgrenzen von Katalase in humanem Nullstuhl bestimmt (Tab. 5).

Aufbau des Sandwich-ELISA:
Die Beschichtung der ELISA-Platten (MaxiSorb; Nunc) erfolgte für 1h bei 37°C mit 100 µl einer mAk-Lösung in Carbonatpuffer, 0,1M, pH9,5. Zur Blockade der noch freien Bindungsstellen wurden 200µl 150mM PBS mit 0,2% Fischgelatine (w / v) pro Napf pipettiert und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschießend folgte ein zweimaliges Waschen mit 250µl Waschpuffer 1 (PBS mit 0,025% Tween). Humanstuhl wurde im Verhältnis 1:10 (w / v) mit 150mM PBS unter Zusatz von 2%

Magermilchpulver und 1mM EDTA suspendiert. Zur Bestimmung der Antigen-Nachweisgrenze wurde gereinigte *H. pylori*-Katalse in bekannten Konzentrationen der Stuhlsuspension eines *H. pylori* negativen Patienten (Nullstuhl) zugegeben. Die Stuhlprobensuspensionen wurden 5min bei 7000g abzentrifugiert. Je 100µl des Überstandes wurden pro Napf für 1h inkubiert. Die Proben wurden als Doppelwerte aufgetragen. Die Platte wurde anschließend 4x mit Waschpuffer 2 (250µl PBS unter Zusatz von 0,2% Tween) gewaschen. Dann wurden 100µl einer Lösung Biotin-gekoppelten in PBS; 0,1% BSA zugegeben und für 60min bei RT inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antigen/Antikörperkomplexe erfolgte durch Zugabe eines Konjugats von Streptavidin mit POD (Dianova). Die POD setzt dann im nächsten Schritt das farblose Substrat TMB (Sigma) in ein blaues Produkt um. Nach 5 bis 10 Minuten, oder sobald auch die Negativkontrolle eine leichte Blaufärbung zeigte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1N Schwefelsäure (100 µl/Napf) gestoppt. Die Stärke der Farbreaktion wurde im ELISA-Reader (MWG Spektral) gemessen. Die Messung erfolgt bei 455 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm.

Als geeigneter Detektor-Antikörper für die Kombination mit allen weiteren getesteten Antikörpern erwies sich HP25.2m/2H10 (Tab. 5). Auf Grund der Affinitätsdaten wurden als Fänger-Antikörper im Schnelltest HP25.6m/1B5, 1G4 und 1H4 getestet. Dabei stellte sich HP25.6m/1B5 als bester Fänger-Antikörper heraus.

**Tabelle 5:** Ergebnisse der Paarfindung der monoklonalen Antikörper gegen Katalase

| | Fänger-Antikörper | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| biotinylierter Detektor-Antikörper | 25.2m/ 2H10 | 25.6m/ 1B5 | 25.6m/ 1G4 | 25.6m/ 1A5 | 25.6m/ 1H4 |
| 25.2m/2H10 | N: 0,03 | 0,1 | 0,03 | 0,1 | 0,03 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | G4: 7-8 | 7 | 8 | 7 | 8 |
| | G0: 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 25.6m/1B5 | N: 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,03 | 0,3 |
| | G4: 8 | 7 | 5 | 7 | 8 |
| | G0: 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 25.6m/1G4 | N: 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,01 | 0,1 |
| | G4: 6-8 | 7 | 8 | 8 | 8 |
| | G0: 1-2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 25.6m/1A5 | N: 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,3 |
| | G4: 6-7 | 7 | 5 | 7 | 8 |
| | G0: 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 25.6m/1H4 | N: 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,1 |
| | G4: 8 | | 4-7 | 7 | 8 |
| | G0: 3 | | 2 | 2 | 2 |

Patientenerkennung (Detektion von 8 kritischen G4- und 4 G0-Patientenproben)
N = Nachweisgrenzen [ng/ml] der Katalase in Nullstuhl
kritisch positiv = Proben, die sich im Nachweis als besonders problematisch erwiesen

**Beispiel 9: Herstellung von Konjugaten zur Verwendung in immunchromatographischen Schnelltests**

**Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Biotin**

Die monoklonalen Antikörper wurden im Anschluß an die Reinigung an Biotin gekoppelt. Die Kopplung erfolgte nach bekannten Methoden (Harlow & Lane, 1988). Die monoklonalen Antikörper wurden bei einer Konzentration von ca. 1-2 mg/ml konjugiert. Vor der Kopplung wurden die Antikörper durch Dialyse in 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer, pH 8,3 bzw. 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer, pH 8,3, umgepuffert. Zu je 1 mg Antikörper wurden 50 µg N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-d-Biotin; Sigma) in DMSO zugegeben und vermischt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die biotinylierten Antikörper von

ungekoppeltem NHS-d-Biotin durch extensive Dialyse gegen 0,15 M PBS, 0,05 % $NaN_3$, pH 7,5 befreit.

**Kopplung von monoklonalen Antikörpern an kolloidales Gold**

Die Kopplung von monoklonalen Antikörpern an kolloidales Gold erfolgte nach bekannten Standardmethoden (Frens, 1973; Geoghegan und Ackerman, 1977; Slot et al., 1985). Goldkolloid mit einer Partikelgröße von 40 nm, OD (520 nm) = 1 (British BioCell, Cardiff, England) wurde mit 0,1 M $K_2CO_3$ auf pH 9 eingestellt. Gereinigter mAk wurde gegen 2 mM Boratpuffer, pH 9,2 dialysiert und auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt. Zur Kopplung wurden 2 ml der mAk-Lösung tropfenweise zu 20 ml der Goldlösung unter schnellem Rühren zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale IgG-Konzentration und der geeignete pH-Wert für die Kopplung wurden für jeden mAk individuell bestimmt Zur Stabilisierung des Gold-IgG-Konjugats wurden 2 ml Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 10% zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Nicht mit IgG gekoppeltes Goldkolloid und freies IgG wurden anschließend durch Zentrifugieren abgetrennt. Dazu wurde der Kopplungsansatz 30 min bei 15 000 RPM (Sorvall, SS-34) zentrifugiert und der klare Überstand mittels Vakuum abgesaugt. Das Gold-IgG-Konjugat, als loses dunkelrot gefärbtes Sediment am Boden des Zentirifugenröhrchens abgesetzt, wurde in 2 ml 20 mM Tris, pH 8,2 mit Zusatz von 1% Rinderserumalbumin und 0,05% $NaN_3$ aufgenommen.

**Beispiel 10: Immunchromatographischer Schnelltest**

Mit dem Antikörperpaar HP25.2m/2H10 und HP25.6m/1B5 wurde ein immunchromatographischer Test im Sandwich-Prinzip aufgebaut. Dieser Test besteht, wie in Fig. 9 und 10 schematisch dargestellt, aus einem Probenauftrag-Bereich (1), einem Filter (2), einem Test- bzw. Analysebereich (3) und einem Absorptionsbereich (4).

Als Signal-bildendes Immunreagenz wurde der gereinigte mAk HP25.2m/2H10 an Gold gekoppelt (British BioCell, Cardiff, England). Das mAk-Goldkonjugat wurde in deionisiertem Wasser mit Zusatz von 5% Saccharose (Sigma, Deisenhofen) auf eine OD (520 nm) von 3 verdünnt und auf ein Konjugatvlies aus Glasfaser (Pall, Dreieich) aufgetragen. Anschließend wurde das Konjugatvlies vakuumgetrocknet.

Als Testbereich (Fig. 10, 3) wurde Nitrocellulose mit einer Fließrate von 95-175 sec/4cm (Millipore, Bedford, MA, USA) mit den die Test- und Kontrollinie bildenden Immunreagentien beschichtet. Hierzu wurde ein spezielles Auftragegerät für Teststreifen (Imagene, Hanover, NH, USA) verwendet. Als Testlinie (Fig. 10, 6) wurde gereinigter mAk HP25.6m/1B5, in Phosphatpuffer pH 7,4 in der Konzentration 1-2 µg/cm aufgetragen. Als Kontrollinie (Fig. 10, 7) wurde ein polyklonaler anti-Maus Antikörper (Dianova, Hamburg) in einer Konzentration von 0,1-0,3 µg/cm aufgetragen.

Anschließend wurden die beschichtete Nitrocellulose und das beschichtete Konjugatvlies zusammen mit den weiteren Komponenten des Teststreifens auf Polyesterträger (G&L, Santa Clara, CA, USA) aufgeklebt und in 5 mm breite Einzelstreifen geschnitten. Als Filter (Fig. 10, 2) wurden Glasfasermaterialien (Ahlstrom, Mt. Holly Springs, PA, USA; Pall, Dreieich; Whatman, Maidstone, England) in einer Breite von 1-2 cm verwendet. Für den Absorptionsbereich (Fig. 10, 4) wurden saugfähigen Zellulose- oder Zellulose-Glasfaser-Materialien in einer Breite von 2-3 cm verwendet (Pall, Dreieich; Schleicher & Schuell, Dassel; Whatman, Maidstone, England).

**Beispiel 11: Immunchromatographischer Schnelltest unter Verwendung von Streptavidin als Testline**

Abweichend vom in Beispiel 10 beschriebenen Schnelltest wurde der dort als Testlinie eingesetzte mAk HP25.6m/1B5 an Biotin gekoppelt und auf ein zweites Konjugatvlies des Probenauftrag-Bereichs aufgetrocknet.

Als Testlinie wurde rekombinantes Streptavidin (Roche, Mannheim) in einer Konzentration von 10-20 mg/ml in Phoshatpuffer, pH 7,4 beschichtet.
In diesem Sandwich-Aufbau sind während der Testdurchführung beide Antikörper-Konjugate mobil und wandern während der Testdurchführung über den Teststreifen. In Anwesenheit von Antigen bildet sich schon während der Wanderung der gesamte Sandwich-Komplex aus, der an der Testlinie über die Bindung von Biotin an Streptavidin abgefangen wird.

**Beispiel 12: Nachweis von *H. pylori* im menschlichen Stuhl mittels immunchromatographischem Schnelltest**

Patientenproben
Zur Evaluierung des immunchromatographischen Schnelltests standen 200 Stuhlproben von Patienten aus zehn verschiedenen Kliniken oder gastro-enterologischen Praxen in Deutschland zur Verfügung. Die Proben stammten sowohl von Patienten, die keine Beschwerden und Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts aufwiesen, als auch von Patienten, die sich aufgrund von Beschwerden oder Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts einer Untersuchung unterzogen. Der Infektionsstatus der Patienten wurde mittels $^{13}$C-Harnstoff Atemtest oder mittels histologischer Untersuchung einer Magenbiopsie-Probe erhoben. Patienten, die widersprüchliche Ergebnisse in diesen beiden als Goldstandard akzeptierten Methoden aufwiesen, wurden nicht in die Evaluierung eingeschlossen. Dem Laborpersonal war der Infektionsstatus der getesteten Patienten nicht bekannt.

Testdurchführung
Zur Durchführung des Schnelltests wurden die Stuhlproben 1:15 in Probenpuffer gelöst und 500 µl der Probenflüssigkeit auf die Auftragezone (Probenauftrag-Bereich) des Teststreifens aufgetragen. Nach 15 Minuten wurde der Test visuell ausgewertet. Das Testsignal an der Testlinie wurde als vorhanden (Testergebnis positiv) oder nicht vorhanden (Testergebnis negativ) eingestuft. Das Ablesen des Testergebnisses wurde jeweils unabhängig voneinander von drei Personen, die

keine Qualifikation als Laborpersonal aufwiesen, vorgenommen. Zusätzlich wurden die Tests vom Laborpersonal halb quantitativ mit 0 (negativ), 1 (schwach positiv) und 2 (stark positiv) bewertet.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse, die mittels des Stuhl-Schnelltests im Vergleich zu den beiden Referenzmethoden bei einer Evaluierung an insgesamt 200 Patientenproben erzielt wurden. Von den insgesamt 100 *H. pylori*-positiven Proben wurden 95 als richtig positiv getestet, bei 5 Proben trat ein falsch negatives Ergebnis auf. Von den insgesamt 100 *H. pylori*-negativen Proben wurden 94 Proben als richtig negativ getestet, bei 6 Proben trat ein falsch positives Ergebnis auf. Sensitivität und Spezifität des Schnelltests betrugen im Vergleich zu den Referenzmethoden 95% und 94%.

**Tabelle 6: Testergebnisse der Goldstandard-Referenzmethoden und des Schnelltests (halb quantitativ) bei der Untersuchung von insgesamt 200 Stuhlproben**

| Probennummer | Atemtest | Magenbiopsie | Schnelltest |
|---|---|---|---|
| 1001 | n.d. | negativ | 0 |
| 1002 | n.d. | negativ | 0 |
| 1007 | n.d. | negativ | 0 |
| 1008 | n.d. | negativ | 0 |
| 1010 | n.d. | negativ | 0 |
| 1012 | n.d. | negativ | 0 |
| 1017 | n.d. | negativ | 0 |
| 1021 | n.d. | negativ | 0 |
| 1022 | n.d. | negativ | 0 |
| 1024 | n.d. | negativ | 0 |
| 1025 | n.d. | negativ | 0 |
| 1027 | n.d. | negativ | 0 |
| 1030 | n.d. | negativ | 0 |
| 1031 | n.d. | negativ | 0 |
| 1032 | n.d. | negativ | 0 |
| 1034 | n.d. | negativ | 0 |
| 1035 | n.d. | negativ | 0 |
| 1040 | n.d. | negativ | 0 |
| 1046 | n.d. | negativ | 0 |
| 2002 | n.d. | negativ | 0 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2006 | n.d. | negativ | 0 |
| 2007 | negativ | n.d. | 0 |
| 2010 | n.d. | negativ | 0 |
| 2012 | negativ | n.d. | 0 |
| 2013 | negativ | n.d. | 0 |
| 2014 | negativ | n.d. | 0 |
| 2015 | n.d. | negativ | 1 |
| 2017 | negativ | negativ | 0 |
| 2018 | negativ | negativ | 0 |
| 2023 | n.d. | negativ | 0 |
| 2024 | negativ | n.d. | 0 |
| 2028 | n.d. | negativ | 0 |
| 2033 | negativ | negativ | 0 |
| 2034 | negativ | negativ | 0 |
| 2043 | n.d. | negativ | 0 |
| 3123 | negativ | n.d. | 0 |
| 3213 | n.d. | negativ | 0 |
| 3224 | negativ | n.d. | 0 |
| 3225 | n.d. | negativ | 0 |
| 4004 | n.d. | negativ | 0 |
| 5004 | n.d. | negativ | 0 |
| 5007 | n.d. | negativ | 0 |
| 5008 | n.d. | negativ | 0 |
| 5009 | n.d. | negativ | 0 |
| 5010 | n.d. | negativ | 0 |
| 5012 | n.d. | negativ | 0 |
| 5013 | n.d. | negativ | 0 |
| 5017 | n.d. | negativ | 0 |
| 5018 | n.d. | negativ | 0 |
| 5019 | n.d. | negativ | 0 |
| 5020 | n.d. | negativ | 0 |
| 5021 | n.d. | negativ | 0 |
| 5022 | n.d. | negativ | 0 |
| 5024 | n.d. | negativ | 0 |
| 5025 | n.d. | negativ | 0 |
| 5027 | n.d. | negativ | 0 |
| 5028 | n.d. | negativ | 0 |
| 5030 | n.d. | negativ | 0 |
| 5031 | n.d. | negativ | 2 |
| 5033 | n.d. | negativ | 0 |
| 5035 | n.d. | negativ | 0 |
| 5036 | n.d. | negativ | 0 |
| 5040 | n.d. | negativ | 0 |
| 5042 | n.d. | negativ | 0 |
| 5046 | n.d. | negativ | 0 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 5052 | n.d. | negativ | 0 |
| 5056 | n.d. | negativ | 1 |
| 5057 | n.d. | negativ | 0 |
| 5060 | n.d. | negativ | 1 |
| 5063 | n.d. | negativ | 0 |
| 5064 | n.d. | negativ | 0 |
| 5066 | n.d. | negativ | 0 |
| 5067 | n.d. | negativ | 0 |
| 5068 | n.d. | negativ | 0 |
| 6002 | n.d. | negativ | 0 |
| 6005 | n.d. | negativ | 0 |
| 6008 | n.d. | negativ | 0 |
| 6009 | n.d. | negativ | 0 |
| 6017 | n.d. | negativ | 0 |
| 6019 | n.d. | negativ | 0 |
| 6024 | n.d. | negativ | 0 |
| 6026 | n.d. | negativ | 0 |
| 6029 | n.d. | negativ | 0 |
| 6033 | n.d. | negativ | 0 |
| 6038 | n.d. | negativ | 0 |
| 6039 | n.d. | negativ | 0 |
| 7005 | n.d. | negativ | 0 |
| 7006 | n.d. | negativ | 2 |
| 7009 | n.d. | negativ | 0 |
| 7013 | n.d. | negativ | 0 |
| 8004 | n.d. | negativ | 0 |
| 8047 | n.d. | negativ | 0 |
| 9004 | n.d. | negativ | 0 |
| 9005 | n.d. | negativ | 0 |
| 9010 | n.d. | negativ | 0 |
| 9011 | n.d. | negativ | 0 |
| 9012 | n.d. | negativ | 0 |
| 9013 | n.d. | negativ | 0 |
| 9015 | n.d. | negativ | 1 |
| 9019 | n.d. | negativ | 0 |
| 213 | n.d. | positiv | 1 |
| 444 | n.d. | positiv | 1 |
| 1003 | n.d. | positiv | 1 |
| 1013 | n.d. | positiv | 2 |
| 1014 | n.d. | positiv | 1 |
| 1015 | n.d. | positiv | 2 |
| 1028 | n.d. | positiv | 1 |
| 1029 | n.d. | positiv | 2 |
| 1037 | n.d. | positiv | 1 |
| 2005 | positiv | n.d. | 2 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2008 | n.d. | positiv | 2 |
| 2009 | positiv | n.d. | 2 |
| 2016 | n.d. | positiv | 2 |
| 2029 | positiv | positiv | 2 |
| 2032 | positiv | positiv | 2 |
| 2035 | n.d. | positiv | 2 |
| 2039 | positiv | positiv | 2 |
| 2040 | n.d. | positiv | 2 |
| 2041 | positiv | positiv | 2 |
| 2042 | positiv | positiv | 2 |
| 3146 | positiv | n.d. | 2 |
| 3219 | positiv | positiv | 2 |
| 3220 | positiv | positiv | 2 |
| 3231 | positiv | positiv | 2 |
| 3234 | positiv | positiv | 2 |
| 3241 | positiv | positiv | 1 |
| 3570 | positiv | n.d. | 2 |
| 4003 | n.d. | positiv | 2 |
| 4005 | positiv | positiv | 1 |
| 4006 | n.d. | positiv | 2 |
| 4018 | n.d. | positiv | 2 |
| 4019 | n.d. | positiv | 2 |
| 4020 | n.d. | positiv | 2 |
| 5001 | n.d. | positiv | 2 |
| 5006 | n.d. | positiv | 2 |
| 5029 | n.d. | positiv | 2 |
| 5039 | n.d. | positiv | 2 |
| 5048 | n.d. | positiv | 2 |
| 5050 | n.d. | positiv | 1 |
| 5053 | n.d. | positiv | 2 |
| 5055 | n.d. | positiv | 2 |
| 5058 | n.d. | positiv | 2 |
| 5061 | n.d. | positiv | 2 |
| 5069 | n.d. | positiv | 1 |
| 5072 | n.d. | positiv | 2 |
| 5075 | n.d. | positiv | 2 |
| 5076 | n.d. | positiv | 2 |
| 5078 | n.d. | positiv | 2 |
| 5090 | n.d. | positiv | 2 |
| 5092 | n.d. | positiv | 2 |
| 5100 | n.d. | positiv | 2 |
| 5150 | n.d. | positiv | 0 |
| 6001 | n.d. | positiv | 2 |
| 6004 | n.d. | positiv | 2 |
| 6013 | n.d. | positiv | 1 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6014 | n.d. | positiv | 2 |
| 6015 | n.d. | positiv | 2 |
| 6018 | n.d. | positiv | 2 |
| 6020 | n.d. | positiv | 1 |
| 6022 | n.d. | positiv | 2 |
| 6027 | n.d. | positiv | 2 |
| 6040 | n.d. | positiv | 2 |
| 6050 | n.d. | positiv | 2 |
| 6052 | n.d. | positiv | 2 |
| 6064 | n.d. | positiv | 2 |
| 6065 | n.d. | positiv | 2 |
| 7001 | n.d. | positiv | 1 |
| 7002 | n.d. | positiv | 2 |
| 7003 | n.d. | positiv | 1 |
| 7020 | n.d. | positiv | 0 |
| 8026 | n.d. | positiv | 0 |
| 8033 | n.d. | positiv | 2 |
| 9001 | n.d. | positiv | 2 |
| 9002 | n.d. | positiv | 2 |
| 9003 | n.d. | positiv | 2 |
| 9006 | n.d. | positiv | 2 |
| 9007 | n.d. | positiv | 1 |
| 9008 | n.d. | positiv | 2 |
| 9009 | n.d. | positiv | 0 |
| 9014 | n.d. | positiv | 2 |
| 9017 | n.d. | positiv | 2 |
| 9018 | n.d. | positiv | 2 |
| 9022 | n.d. | positiv | 2 |
| T 01 | positiv | n.d. | 2 |
| T 02 | positiv | n.d. | 2 |
| T 03 | positiv | positiv | 2 |
| T 04 | positiv | positiv | 1 |
| T 05 | positiv | positiv | 1 |
| T 07 | positiv | positiv | 1 |
| T 09 | positiv | n.d. | 2 |
| T 10 | positiv | n.d. | 1 |
| T 13 | n.d. | positiv | 2 |
| T 53 | positiv | n.d. | 2 |
| T 58 | positiv | n.d. | 1 |
| T 64 | positiv | n.d. | 2 |
| T 67 | positiv | n.d. | 1 |
| T 68 | positiv | n.d. | 2 |
| T 70 | positiv | n.d. | 1 |
| T 77 | positiv | n.d. | 0 |
| T 88 | positiv | n.d. | 2 |

n.d.: nicht bestimmt; 0: negativ; 1: schwach positiv; 2: stark positiv

**(n=200)**

| **Methode** | | **Goldstandard** | |
|---|---|---|---|
| | | **positiv** | **negativ** |
| ***H. pylori*-Schnelltest** | **positiv** | **95** | **6** |
| | **negativ** | **5** | **94** |

**Sensitivität: 95%**

**Spezifität: 94%**

**Beispiel 13: Klonierung und Sequenzbestimmung der funktionellen variablen Bereiche von Immunoglobulinen aus Hybridom-Zellinien**

Gesamt-RNA wurde aus Antikörper-produzierenden Hybridom-Zellinien nach Chomczynski (Chomczynski, 1987) isoliert. Die entsprechende cDNA wurde nach Standard-Methoden synthetisiert (Sambrook et al., 1989)

Die DNA-Regionen, welche die kappa leichte Kette sowie das schwere Kette-Fd-Segment (VH bzw. CH1) der jeweiligen Antikörper kodieren, wurden mittels PCR amplifiziert. Dabei kam das in Tabelle 7 aufgeführte Oligunukleotid-Primer Set zur Anwendung. Die aus den einzelnen Hybridom-Zellinien isolierte cDNA diente als Matritze.

Das eingesetzte Primer-Set führt zu je einer 5'-*Xho* I und einer 3'-*Spe* I Schnittstelle in den schwere Kette-Fd-Fragmenten sowie je einer 5'-*Sac* I und einer 3'-*Xba* I-Schnittstelle in den kappa leichten Ketten. Zur PCR-Amplifikation der schwere Kette-Fd-kodierenden DNA-Fragmente wurden 11 verschiedene 5'-VH-Primer (MVH 1-8 und MULH1-3) jeweils kombiniert mit dem 3'-VH-Primer MIgG2a (HP25.2m/2H10) bzw. mit dem 3'-VH-Primer MIgG1 (HP25.6m/1B5) verwendet. Zur Amplifikation der DNA-Fragmente, welche für die kappa leichten Ketten codieren, wurden 11 verschiedene 5'-VK-Primer (MUVK 1-7 und MULK1-4) jeweils mit dem 3'-VK-Primer 3'MUCK kombiniert.

Das folgende Temperaturprogramm kam bei allen PCR-Amplifikationen zur Anwendung: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Primer-Anlagerung bei 52°C für 60 s, Polymerisation bei 72°C für 90 s. Dieses Programm wurde für 40 Zyklen beibehalten, gefolgt von einer 10 min abschließenden Vervollständigung der Fragmente bei 72°C.

Die Ergebnisse der PCR-Amplifikationen wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und DNA-Banden des erwarteten Molekulargewichts isoliert.

Für den Antikörper 25.2m/2H10 wurden die isolierten Banden anschließend einem Restriktionsverdau unter Einsatz der Enzyme *Xho* I und *Spe* I (schwere Ketten) bzw. *Sac* I und *Xba* I (leichte Ketten) unterzogen und die erhaltenenen Fragmente in den Plasmid-Vektor Bluescript KS (Stratagene) kloniert, nachdem dieser zunächst mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Spe* I bzw. *Sac* I und *Xba* I gespalten worden war.

Plasmid-Präparationen der klonierten schwere und leichte Ketten-Fragmente wurden daraufhin sequenzanalysiert. Es wurden Sequenzen ausgewählt, die für funktionelle variable Bereiche der Immunglobulin schwere und leichte Kette (VH bzw. VL) codieren. Auf diese Weise konnte für diese Hybridom-Zellinie genau ein funktioneller VH- und ein funktioneller VL-Bereich identifiziert werden. Die funktionellen VH- und VL-Sequenzen sind in Fig. 1/Fig. 2 wiedergegeben. Die ersten vier Aminosäuren der VH-Region wurden durch Umklonierung ergänzt. Klonierung und Sequenzierung wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

Für den Antikörper 25.6m/1B5 wurden die isolierten Banden anschließend direkt sequenziert und eine funktionelle leichte und eine funktionelle schwere Kette identifiziert. Das schwere-Ketten-Fd-Fragment und die leichte Kette wurden anschließend einem Restriktionsverdau unter Einsatz der Enzyme XhoI und SpeI (Schwere Kette) bzw. SacI und XbaI (Leichte Kette) unterzogen und die erhaltenenen Fragmente in den Plasmid-Vektor pBSIIIHisEx (Connex) kloniert, nachdem dieser mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Spe* I bzw. *Sac* I und *Xba* I gespalten worden war, und erneut sequenziert.

Auf diese Weise konnte für diese Hybridom-Zellinie genau ein funktioneller VH- und ein funktioneller VL-Bereich identifiziert werden. Die funktionellen VH- und VL-Sequenzen sind in Fig. 3/Fig. 4 wiedergegeben. Bei den VH- und VL Sequenzen sind die reifen N-Termini dargestellt, wie sie durch die Sequenzierung mittels Leaderprimer ermittelt wurden. Klonierung und Sequenzierung wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

**Tabelle 7:** Liste der für die PCR-Amplifikation der funktionellen variablen Bereiche von schweren und leichten Immunglobulin-Ketten verwendeten Primer (Orientierung 5' - 3')

| | |
|---|---|
| MVH1 | (GC)AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT |
| MVH2 | GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT |
| MVH3 | CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT |
| MVH4 | GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA |
| MVH5 | GA(AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA |
| MVH6 | GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT |
| MVH7 | GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA |
| MVH8 | GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT |
| MULK1 | GGG GAG CTC CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT CCT GCT AT |
| MULK2 | GGG GAG CTC CAC CAT GGA TTT TCA AGT GCA GAT TTT CAG |
| MULK3 | GGG GAG CTC CAC CAT GGA GWC ACA KWC TCA GGT CTT TRT A |
| MULK4 | GGG GAG CTC CAC CAT GKC CCC WRC TCA GYT YCT KGT |
| MIgG1 | TAT GCA ACT AGT ACA ACC ACA ATC CCT GGG |
| MIgG2a | GAG AGA GGG GTT CTG ACT AGT GGG CAC TCT GGG CTC |
| MUVK1 | CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT |
| MUVK2 | CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC |
| MUVK3 | CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA |
| MUVK4 | CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA |
| MUVK5 | CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA |
| MUVK6 | CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA |
| MUVK7 | CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA |
| MULH1 | GGG CTC GAG CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT |
| MULH2 | GGG CTC GAG CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT |
| MULH3 | GGG CTC GAG CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT |
| 3`MUCK | GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A |

**Literatur:**

**Coller & Coller, 1983:** Coller, H.A., Coller, B.S., Meth. Enzymol. **121**:412-417

**Harlow & Lane, 1988:** Harlow, E., Lane, D., Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, New York

**Kearney et al., 1979:** Kearney, J. Immunol. **123**: 1548-1550

**Laemmli, 1970:** Laemmli, E.K., Nature **227**: 680-685

**Peters & Baumgarten, 1990:** Peters, J.H., Baumgarten, H. (Hrsg.), Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, Berlin

**Fägerstam et al., 1990:** Fägerstam, L.G. et al., J. Mol. Recognit. **3**: 208-214

**Malmqvist, 1996**: Methods **9**: 525-532

**Eschweiler et al., 1993:** Eschweiler, B., et al., Zentralbl. F. Bakt. **280**: 73-85

**Pharmacia Biotech, 1994:** Monoclonal Antibody Purification Handbook

**Chomczynski, 1987:** Anal. Biochem. **162**: 156-159

**Sambrook et al., 1989:** Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, second edition

**Vaughan et al., 1998:** Nature Biotechnology **16**: 535-539

**Orlandi et al., 1989:** Proc. Natl. Acad. Sci USA **86**: 3833-3837

**Janeway & Travers, 1997:** Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

**Osborne et al., 1997:** Curr. Opin. Chem. Biol. **1**: 5-9

**Stull und Szoka, 1995:** Pharm. Res. **12**: 465-483

**Frens, 1973:** Nat. Phys. Sci. **241**, 20-23

**Geoghegan and Ackerman, 1977:** J. of Histochemistry and Cytochemistry, **25(11)**, 1187-1200

**Slot, 1985:** Eur. J. Cell Biol. **38**, 87-93

**Manos et al., 1998**: Helicobacter **3** (1), 28-38

**Haque, 1993:** J. Infect. Dis. **167**: 247-9

**Park, 1996:** J. Clin. Microbiol. **34**: 988-990

**Hasan, 1994:** FEMS Microbiol. Lett. 120: 143-148

**Koopmans,1993:** J. Clin. Microbiol. 31: 2738-2744

**Machnicka,1996:** Appl. Parasitol. 37: 106-110

**Bravo et al., 1999:** Proteins 34 (2), 155-166

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Infektion eines Säugers mit einem Säure-resistenten Mikroorganismus, das folgende Schritte umfaßt:
   (a) Bereitstellen eines immunchromatographischen Tests mit einem Probenauftragbereich zum Auftragen einer Stuhlprobe des Säugers mit einem Antigen und Auftragen der Stuhlprobe,
   (b) Inkubieren der Stuhlprobe unter Verwendung (i) eines ersten Rezeptors unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit dem Rezeptor erlauben; oder (ii) mindestens zweier unterschiedlicher erster Rezeptoren unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit den beiden ersten Rezeptoren erlauben und wobei der erste Rezeptor gemäß (i) oder die ersten Rezeptoren gemäß (ii) ein Antigen spezifisch bindet/binden, das zumindest bei einem Teil der Säuger nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur oder der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert,
   (c) Bereitstellen eines an einem Analysebereich immobilisierten zweiten Rezeptors, wobei der zweite Rezeptor einen Antigen-Rezeptorkomplex gemäß (b) bindet, und
   (d) Transportieren und Nachweisen der Bildung mindestens eines Antigen-Rezeptorkomplexes gemäß (b) durch Akkumulieren des Antigen-Rezeptorkomplexes an dem zweiten Rezeptor im Analysebereich.

2. Immunchromatographischer Test zum Nachweis einer Infektion eines Säugers mit einem Säure-resistenten Mikroorganismus, wobei der Test

insbesondere geeignet bzw. ausgebildet ist, ein Verfahren nach Anspruch 1 auszuführen, mit:

(a) einem Probenauftragbereich (1, 2) zum Auftragen einer Stuhlprobe des Säugers mit einem Antigen,

(b) einer Einrichtung zum Inkubieren der Stuhlprobe unter Verwendung (i) eines ersten Rezeptors (5) unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit dem Rezeptor erlauben; oder (ii) zweier unterschiedlicher erster Rezeptoren unter Bedingungen, die eine Komplexbildung des Antigens aus dem Säure-resistenten Mikroorganismus mit den beiden ersten Rezeptoren erlauben und wobei der erste Rezeptor gemäß (i) oder die ersten Rezeptoren gemäß (ii) ein Antigen spezifisch bindet/binden, das zumindest bei einem Teil der Säuger nach der Darmpassage eine Struktur aufweist, die der nativen Struktur oder der Struktur entspricht, gegen die ein Säuger nach Infektion oder Immunisierung mit dem Säure-resistenten Mikroorganismus oder einem Extrakt oder Lysat davon oder einem Protein daraus oder einem Fragment davon oder einem synthetischen Peptid Antikörper produziert,

(c) einem an einem Analysebereich immobilisierten zweiten Rezeptor (6), wobei der zweite Rezeptor (6) einen Antigen-Rezeptorkomplex gemäß (b) bindet, und

(d) einer Transporteinrichtung (3), die den Antigen-Rezeptorkomplexes gemäß (b) zum Analysebereich mit dem immobilisierten zweiten Rezeptor (6) zum Akkumulieren des Analyten-Rezeptorkomplexes transportiert.

3. Verfahren bzw. Test nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Stuhlprobe vor dem Auftragen suspendiert wird.

4. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Teststreifen mit einem Analysebereich aus Zellulose oder Zellulosederivat

bereitgestellt wird und das Trägermaterial geeignet ist, dass der Transport über die Kapillarkräfte im Trägermaterial geschieht.

5. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Probenauftragbereich ein Konjugatvlies (1) und ein in Transportrichtung nachgeordneten Filter (2) aufweist, der geeignet ist, im wesentlichen die Feststoffanteile des Stuhls bzw. der Stuhlsuspension zu filtern.

6. Verfahren bzw. Test nach Anspruch 5, wobei der Filter (2) eine Ausschlußgröße von 1 bis 2 µm aufweist.

7. Verfahren bzw. Test nach Anspruch 5 oder 6, wobei der Filter aus Glasfaser und/oder Polyester-Glasfaser-Gemischen hergestellt ist.

8. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei der Teststreifen auf einem Polyesterträger fest angeordnet ist.

9. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als erste(r) und/oder zweiter Rezeptor(en) Antikörper bzw. Antikörperkonjugate bereitgestellt werden.

10. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 4 bis 9, wobei der/die erste(n) Rezeptor(en) (5) durch die Suspension lösbar und/oder der zweite Rezeptor (6) durch die Suspension unlösbar auf den Teststreifen immobilisiert bzw. aufgetrocknet ist/sind.

11. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Fall (i) der erste Rezeptor (5) bzw. im Fall (ii) einer der ersten Rezeptoren mit sichtbaren bzw. farbigen Partikeln, partikulären Direktmarkierungen wie mit kolloidalem Gold oder Polystyrol (Latex) markiert ist, deren Größe typischerweise im Bereich zwischen 5 nm und 100nm, vorzugsweise zwischen 40nm und 60nm, besonders bevorzugt 40 bis 60 nm für die

Verwendung von Gold bzw. 200nm bis 500nm für die Verwendung von Latex liegt, oder mittels eines weiteren Rezeptors, der im Fall (i) spezifisch den ersten Rezeptor bzw. im Fall (ii) einen der ersten Rezeptoren bindet, markiert wird, wobei der weitere Rezeptor mit sichtbaren bzw. farbigen Partikeln, partikulären Direktmarkierungen wie mit kolloidalem Gold oder Polystyrol (Latex) markiert ist, deren Größe typischerweise im Bereich zwischen 5 nm und 100nm, vorzugsweise zwischen 40nm und 60nm, besonders bevorzugt 40 bis 60 nm für die Verwendung von Gold bzw. 200nm bis 500nm für die Verwendung von Latex liegt .

12. Verfahren bzw. Test nach Anspruch 11, wobei im Fall (ii) mindestens einer der ersten Rezeptoren, die nicht mit sichtbaren bzw. farbigen Partikeln markiert sind, mit Biotin konjugiert ist und der zweite Rezeptor (6) Streptavidin und bevorzugt Polystreptavidin ist, so dass der (die) erste(n) biotinylierte(n) Rezeptor(en) über Streptavidin an der Testlinie immobilisiert wird (werden).

13. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in Transportrichtung hinter dem Testabschnitt ein Kontrollabschnitt, wie bevorzugt eine Kontrolllinie, ausgebildet ist.

14. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 4 bis 13, wobei der Teststreifen im wesentlichen in Transportrichtung an seinem Ende einen Absorptionsbereich (4) aufweist.

15. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 4 bis 14, wobei der Teststreifen eine Breite von 3 bis 10 mm, bevorzugt etwa 5 mm, und eine Länge von 50 bis 100 mm, bevorzugt 75 mm, hat.

16. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 4 bis 15, wobei die Länge des Konjugatvlieses (1) 5 bis 30 mm, bevorzugt etwa 25 mm, die Überlappung von Konjugatvlies (1) und Filter in Fließrichtung 5 bis 15 mm,

bevorzugt etwa 10 mm; bei Verwendung von zwei Konjugatvliesen die Länge des ersten Konjugatvlieses bevorzugt etwa 25 mm, die Überlappung des ersten und zweiten Konjugatvlieses in Fließrichtung bevorzugt etwa 12,5 mm, die Länge des zweiten Konjugatvlieses bevorzugt etwa 12,5 mm, die Überlappung von zweitem Konjugatvlies und Filter (2) in Fließrichtung bevorzugt etwa 10 mm, die Länge des Test- bzw. Analysebereichs 10 bis 30 mm, bevorzugt etwa 20 mm, die Breite etwa 5 mm und die Überlappung von Test- bzw. Analysebereich und Absorptionsbereich in Fließrichtung bevorzugt etwa 1 mm beträgt.

17. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Mikroorganismus ein Säure-resistentes Bakterium, bevorzugt ein Bakterium der Gattung Helicobacter, Campylobacter oder der Gattung Mycobacterium und besonders bevorzugt ein Bakterium der Spezies *Helicobacter pylori, Helicobacter hepaticus, Campylobacter jejuni* oder *Mycobacterium tuberculosis* ist., wobei vorzugsweise das Antigen das Antigen einer Katalase, Urease oder einer Metalloproteinase, vorzugsweise von *H. pylori*, ist.

18. Verfahren bzw. Test nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Rezeptor/die Rezeptoren (ein) Antikörper, (ein) Fragment(e) oder Derivat(e) davon oder (ein) Aptamer(e) ist/sind oder weiter bevorzugt ein Maus-Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon oder ein chimärer, vorzugsweise ein humanisierter Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon ist, oder ein Bindepartner, vorzugsweise Avidin, Streptavidin, Polystreptavidin und Biotin.

19. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 17 oder 18, wobei für den Nachweis ein Gemisch von Rezeptoren eingesetzt wird, wobei das Gemisch von Rezeptoren als Fänger des Antigens fungiert, wenn der Rezeptor als Detektor des Antigens eingesetzt wird und/oder das Gemisch als Detektor des Antigens fungiert, wenn der Rezeptor als Fänger des Antigens

eingesetzt wird und vorzugsweise das Gemisch von Rezeptoren ein polyklonales Antiserum ist.

20. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei für den Nachweis Gemische von Rezeptoren eingesetzt werden, wobei ein Gemisch von Rezeptoren als Fänger des Antigens fungiert und ein Gemisch von Rezeptoren als Detektor des Antigens fungiert und vorzugsweise mindestens ein Gemisch ein polyklonales Serum ist.

21. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei ein Gemisch von Rezeptoren sowohl als Fänger als auch als Detektor des Antigens fungiert und vorzugsweise das Gemisch ein polyklonales Antiserum ist.

22. Verfahren bzw. Test nach Anspruch 19, wobei das polyklonale Antiserum gegen ein Lysat des Mikroorganismus gewonnen wurde und vorzugsweise das Lysat ein Lysat mit angereichertem Antigen ist und weiter bevorzugt das Lysat ein Lysat mit abgereicherten immundominanten Antigenen ist, oder wobei das polyklonale Antiserum gegen ein aufgereinigtes oder ein (semi)synthetisch hergestelltes Antigen gewonnen wurde und bevorzugt das Antigen ein Antigen einer Katalase, Urease oder Metalloproteinase ist.

23. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei der (die) Rezeptor(en), der (die) Fänger des Antigens (a) fungiert (fungieren) und/oder der (die) Rezeptor(en), der (die) als Detektor des Antigens (b) fungiert (fungieren), jeweils durch einen Immunkomplex ersetzt wird (werden), der im Fall

(a) aus mindestens einem unmarkierten Antikörper, der spezifisch das Antigen bindet und einem markierten Antikörper, der spezifisch diesen mindestens einen unmarkierten Antikörper bindet, im Fall

(b) aus mindestens einem nicht immobilisierten Antikörper, der spezifisch das Antigen bindet und einem an der Testlinie immobilisierten

Antikörper, der spezifisch diesen mindestens einen nicht immobiliserten Antikörper bindet,

besteht.

24. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 19 oder 23, wobei der Rezeptor und/oder das Gemisch von Rezeptoren (ein) Konformationsepitop(e) bindet/n.

25. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: NYWIH

CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3: EGYDGFDS

und wobei bevorzugt die die schwere Kette des Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: AACTACTGGA TTCAC

CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT TACAATCAGG ACTTTCAGGA C

CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

und wobei weiter bevorzugt die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: SASSSVNYMY

CDR2: DTSKLAS

CDR3 . QQWSSNPYT

und wobei weiter bevorzugt die die leichte Kette des Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTAAA TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

26. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die schwere Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

und wobei bevorzugt die die schwere Kette des Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: GACACCTATGTGCAC

CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAAACTAAATATGACCC GATATTCCAGGCC

CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

und wobei weiter bevorzugt die leichte Kette des ein Katalase-Epitop bindenden Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: KASQDVGTSVA

CDR2: WTSTRHT

CDR3: QQYSSSPT

und wobei weiter bevorzugt die die leichte Kette des Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC

CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die schwere Kette des ein Epitop der β-Urease bindenden Antikörpers mindestens eine der

folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPDSLKG

CDR3: DYSWYALDY

oder:

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die die schwere Kette kodierende DNA-Sequenz des Antikörpers mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

oder:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24, wobei die leichte Kette des ein Epitop der β-Urease bindenden Antikörpers mindestens eine der

folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSESIS

CDR3: QQSNTWPLT

oder:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die die leichte Kette des Antikörpers kodierende DNA-Sequenz mindestens eine der folgenden CDRs, vorzugsweise die CDR3 und weiter bevorzugt alle drei folgenden CDRs aufweist:

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC

CDR2: TAT GGTTCTGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

oder:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCAACT TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

31. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 18 bis 30, wobei die Antikörper in den variablen Regionen der leichten und schweren Ketten die in den Figuren 1 und 2 oder 3 und 4 bzw. 5 und 6 oder 7 und 8 dargestellten Aminosäuresequenzen aufweisen.

32. Verfahren bzw. Test nach einem der Ansprüche 18 bis 31, wobei die kodierenden Bereiche der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten die in den Figuren 1 und 2 oder 3 und 4 bzw. 5 und 6 oder 7 und 8 dargestellten DNA-Sequenzen aufweisen.

33. Verfahren bzw. Test nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei mit der Stuhlprobe vor der Inkubation mit den Antikörpern folgende Schritte durchgeführt werden: Resuspendieren der Stuhlprobe 1: 3 bis 1:25, vorzugsweise 1:5, besonders bevorzugt etwa 1:15 in Probenpuffer.

34. Verfahren bzw. Test nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der gleiche Rezeptor zur Bindung an die Festphase wie zum Nachweis des Epitops eingesetzt wird.

35. Verfahren bzw. Test nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Rezeptor ein monoklonaler Maus-Antikörper ist.

36. Verfahren bzw. Test nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Säuger ein Mensch ist.

37. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem anstelle einer Stuhlprobe Atemkondensat, Magengase, Zahnplaque, Speichel, Schleimhautabstriche, Biopsien, Vollblut oder Serum zum Nachweis eingesetzt wird.

38. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem es sich um ein automatisiertes Verfahren handelt.

39. Monoklonaler Antikörper, Fragment oder Derivat davon, der/das eine V-Region aufweist, die eine geeignete Kombination in mindestens einem der in Ansprüchen 25 bis 32 definierten CDRs umfaßt.

40. Monoklonaler Antikörper, Fragment oder Derivat davon nach Anspruch 39, der/das mindestens eine der in den Figuren 1 und 2 oder 3 und 4 bzw. 5 und 6 oder 7 und 8 dargestellten V-Regionen aufweist.

41. Monoklonaler Antikörper, Fragment oder Derivat davon nach Anspruch 39 oder 40, der ein Maus-Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon oder ein chimärer, vorzugsweise ein humanisierter Antikörper oder ein Fragment oder Derivat davon ist.

42. Aptamer, das dasselbe Epitop wie der monoklonale Antikörper, das Fragment oder Derivat davon nach einem der Ansprüche 39 bis 41 spezifisch bindet.

43. Epitop, das von einem monoklonaler Antikörper, Fragment oder Derivat davon nach einem der Ansprüche 39 bis 41 oder dem Aptamer nach Anspruch 42 spezifisch gebunden wird.

44. Antikörper, Fragment oder Derivat davon, der/das ein Epitop nach Anspruch 43 spezifisch bindet.

45. Kit enthaltend mindestens einen Test nach einem der Ansprüche 2 bis 44.

Fig. 1

```
+1   E  V  Q  L  L  E  Q  P  G  A
     GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGCCTGGGGCT  30

+1   E  L  A  K  P  G  A  S  V  K
     GAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG  60

+1   M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
     ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTT  90

+1   T  N  Y  W  I  H  W  V  K  Q
     ACTAACTACTGGATTCACTGGGTGAAACAG  120

+1   R  P  G  Q  G  L  K  W  I  G
     AGGCCTGGACAGGGTCTGAAATGGATTGGA  150

+1   Y  I  N  P  A  T  G  S  T  S
     TACATTAATCCTGCCACTGGTTCCACTTCT  180

+1   Y  N  Q  D  F  Q  D  R  A  T
     TACAATCAGGACTTTCAGGACAGGGCCACT  210

+1   L  T  A  D  K  S  S  T  T  A
     TTGACCGCAGACAAGTCCTCCACCACAGCC  240

+1   Y  M  Q  L  T  S  L  T  S  E
     TACATGCAGCTGACCAGCCTGACATCTGAG  270

+1   D  S  S  V  Y  Y  C  A  R  E
     GACTCTTCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAG  300

+1   G  Y  D  G  F  D  S  W  G  Q
     GGGTACGACGGGTTTGACTCCTGGGGCCAA  330

+1   G  T  T  L  T  V  S  S
     GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA        360
```

Fig. 2

```
+1    E   L   V   L   T   Q   S   P   A   I
      GAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATC                30

+1    M   S   A   S   P   G   E   K   V   T
      ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC                60

+1    M   T   C   S   A   S   S   S   V   N
      ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAT                90

+1    Y   M   Y   W   Y   Q   Q   K   S   G
      TACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGC               120

+1    T   S   P   K   R   W   I   Y   D   T
      ACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACA               150

+1    S   K   L   A   S   G   V   P   A   R
      TCCAAATTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC               180

+1    F   S   G   S   G   S   G   T   S   Y
      TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC               210

+1    S   L   T   L   S   S   M   E   A   E
      TCTCTCACACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA               240

+1    D   A   A   T   Y   Y   C   Q   Q   W
      GATGCCGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGG               270

+1    S   S   N   P   Y   T   F   G   G   G
      AGTAGTAATCCGTACACGTTCGGAGGGGGG               300

+1    T   K   L   E   I   K
      ACCAAGCTGGAGATAAAA                           330
```

Fig. 3

```
+1   E  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E
     GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAG  30

+1   L  V  K  P  G  A  S  V  K  L
     CTTGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTCAAGTTG  60

+1   S  C  T  S  S  G  F  N  I  K
     TCCTGCACATCTTCTGGCTTCAACATTAAA  90

+1   D  T  Y  V  H  W  M  K  Q  R
     GACACCTATGTGCACTGGATGAAACAGAGG 120

+1   P  E  Q  G  L  E  W  I  G  K
     CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAG 150

+1   I  D  P  A  N  G  K  T  K  Y
     ATTGATCCTGCGAATGGTAAAACTAAATAT 180

+1   D  P  I  F  Q  A  K  A  T  M
     GACCCGATATTCCAGGCCAAGGCCACTATG 210

+1   T  A  D  A  S  S  N  T  A  Y
     ACAGCAGACGCATCCTCCAATACAGCCTAC 240

+1   L  Q  L  S  S  L  T  S  E  D
     CTGCAACTCAGCAGCCTGACTTCTGAGGAC 270

+1   T  A  V  Y  Y  C  A  L  P  I
     ACTGCCGTCTATTACTGTGCTCTCCCCATT 300

+1   Y  Y  A  S  S  W  F  A  Y  W
     TATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTACTGG 330

+1   G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
     GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 360
```

Fig. 4

```
+1   D   I   V   M   T   Q   S   H   K   F
     GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC                30

+1   M   S   T   S   V   G   D   R   V   S
     ATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC                60

+1   I   T   C   K   A   S   Q   D   V   G
     ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGT                90

+1   T   S   V   A   W   Y   Q   Q   K   P
     ACTTCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCT               120

+1   G   H   S   P   K   L   L   I   Y   W
     GGGCACTCTCCTAAATTACTGATTTACTGG               150

+1   T   S   T   R   H   T   G   V   P   D
     ACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT               180

+1   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D
     CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT               210

+1   F   I   L   T   I   S   N   V   Q   S
     TTCATTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT               240

+1   E   D   L   A   D   Y   F   C   Q   Q
     GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAA               270

+1   Y   S   S   S   P   T   F   G   G   G
     TATAGCAGCTCTCCCACGTTCGGAGGGGGG               300

+1   A   K   V   E   I   K
     GCCAAGGTGGAAATAAAA                           330
```

Fig. 5

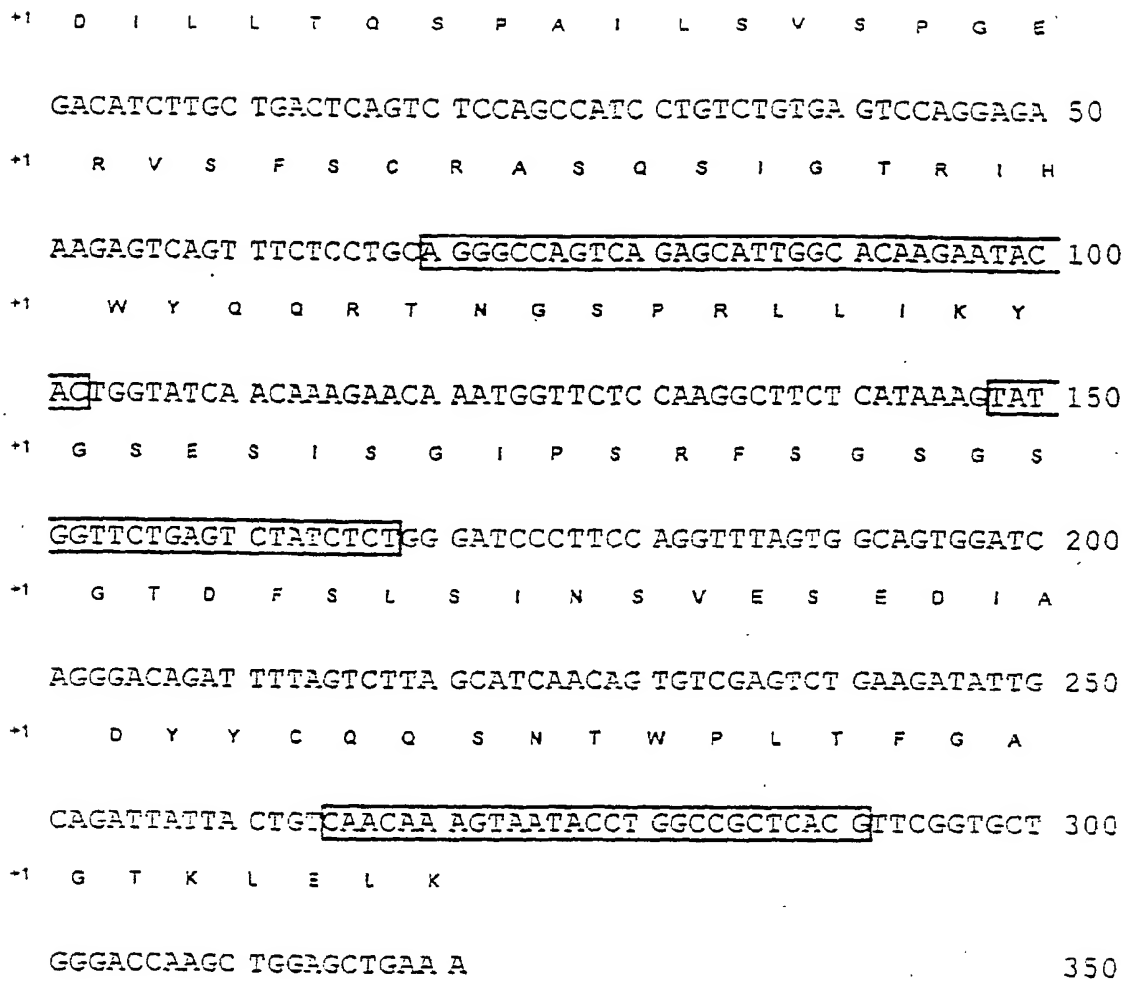

+1 D I L L T Q S P A I L S V S P G E
GACATCTTGC TGACTCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTCCAGGAGA 50
+1 R V S F S C R A S Q S I G T R I H
AAGAGTCAGT TTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC 100
+1 W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y
ACTGGTATCA ACAAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT 150
+1 G S E S I S G I P S R F S G S G S
GGTTCTGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
+1 G T D F S L S I N S V E S E D I A
AGGGACAGAT TTTAGTCTTA GCATCAACAG TGTCGAGTCT GAAGATATTG 250
+1 D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A
CAGATTATTA CTGTCAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
+1 G T K L E L K
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

**Fig. 6**

```
+1  E  V  Q  L  L  E  Q  S  G  A  E  L  V  K  P  G  A

GAGGTGCAGC TGCTCGAGCA GTCTGGAGCT GAGCTGGTGA AGCCTGGGGC 50

+1  S  V  K  I  S  C  K  A  S  G  Y  A  F  S  T  S  W

CTCAGTGAAG ATTTCCTGCA AGGCTTCTGG CTACGCATTC AGTACCTCCT 100

+1  M  N  W  V  K  Q  R  P  G  K  G  L  E  W  I  G

GGATGAACTG GGTGAAACAG AGGCCTGGAA AGGGTCTTGA GTGGATTGGA 150

+1  R  I  Y  P  G  D  G  D  T  N  Y  N  G  K  F  K  G

CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG 200

+1  K  A  T  L  T  A  D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L

CAAGGCCACA CTGACTGCAG ACAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCAAC 250

+1  N  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  F  C  V  R  E

TCAACAGCCT GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTACTTCTG TGTAAGAGAG 300

+1  D  A  Y  Y  S  N  P  Y  S  L  D  Y  W  G  Q  G  T

GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTACTGGG GTCAAGGAAC 350

+1  S  V  T  V  S  S

CTCAGTCACC GTCTCCTCA                                   400
```

**Fig. 7**

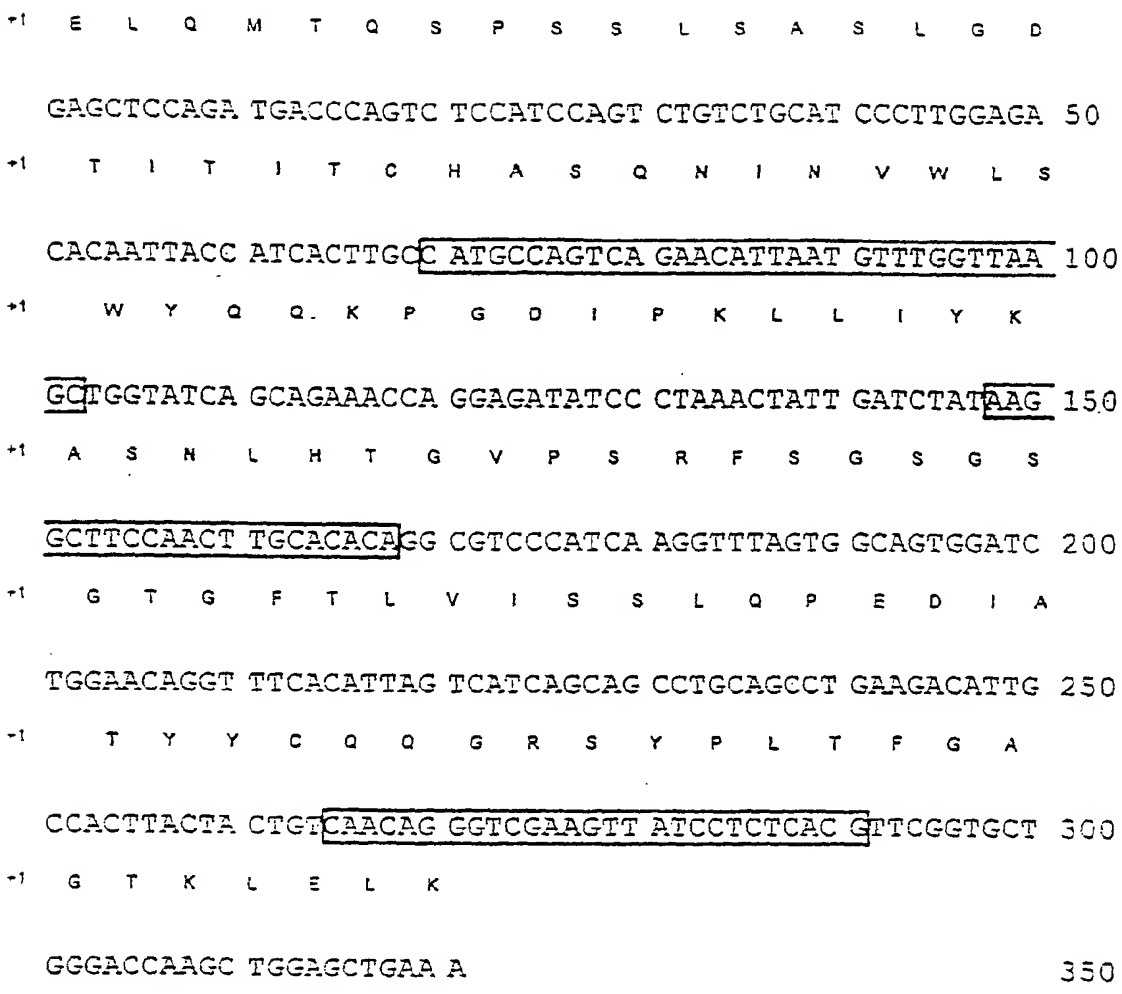

+1 E L Q M T Q S P S S L S A S L G D
GAGCTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCAGT CTGTCTGCAT CCCTTGGAGA 50
+1 T I T I T C H A S Q N I N V W L S
CACAATTACC ATCACTTGCC ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA 100
+1 W Y Q Q K P G D I P K L L I Y K
GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGAGATATCC CTAAACTATT GATCTATAAG 150
+1 A S N L H T G V P S R F S G S G S
GCTTCCAACT TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
+1 G T G F T L V I S S L Q P E D I A
TGGAACAGGT TTCACATTAG TCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG 250
+1 T Y Y C Q Q G R S Y P L T F G A
CCACTTACTA CTGTCAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC GTTCGGTGCT 300
+1 G T K L E L K
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

**Fig. 8**

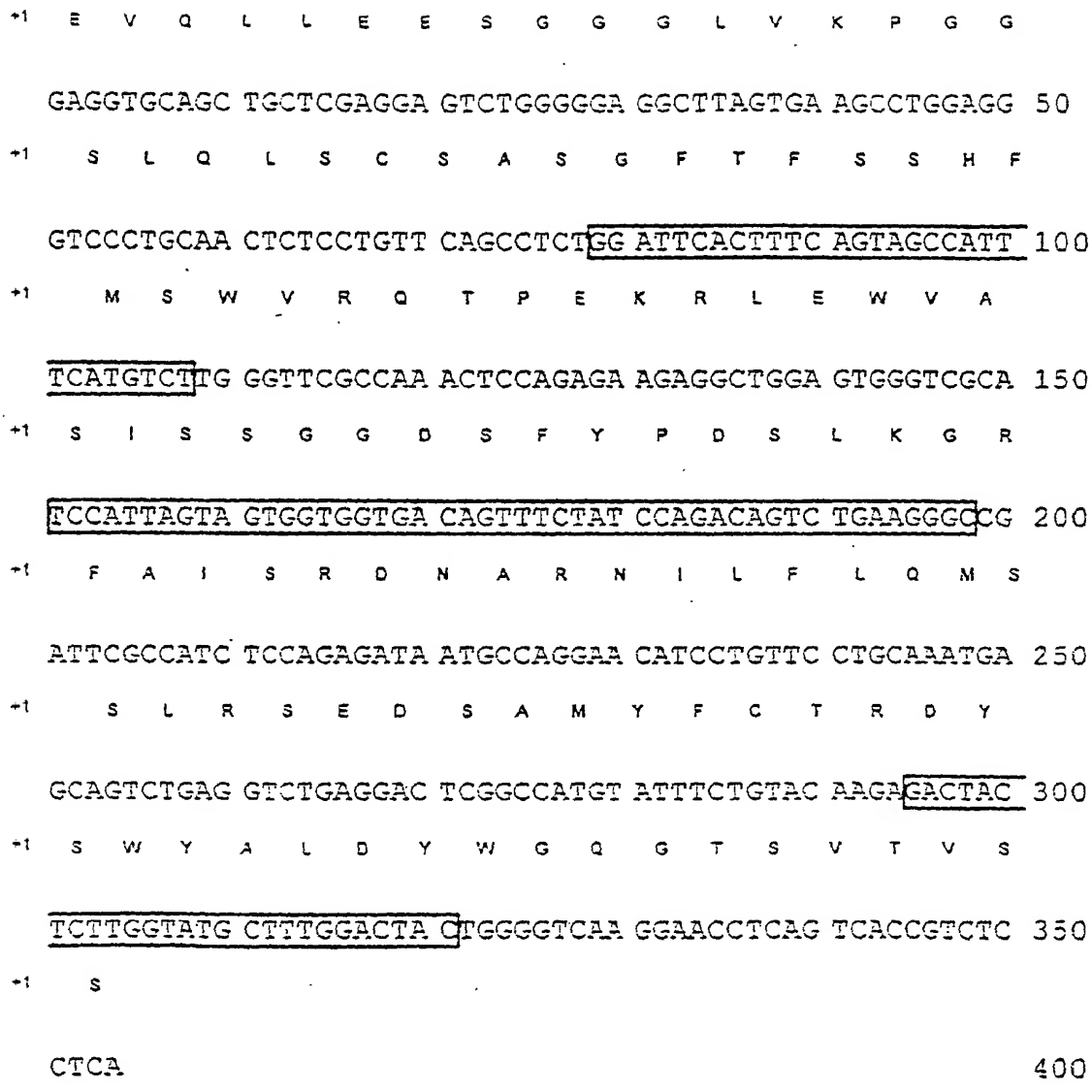
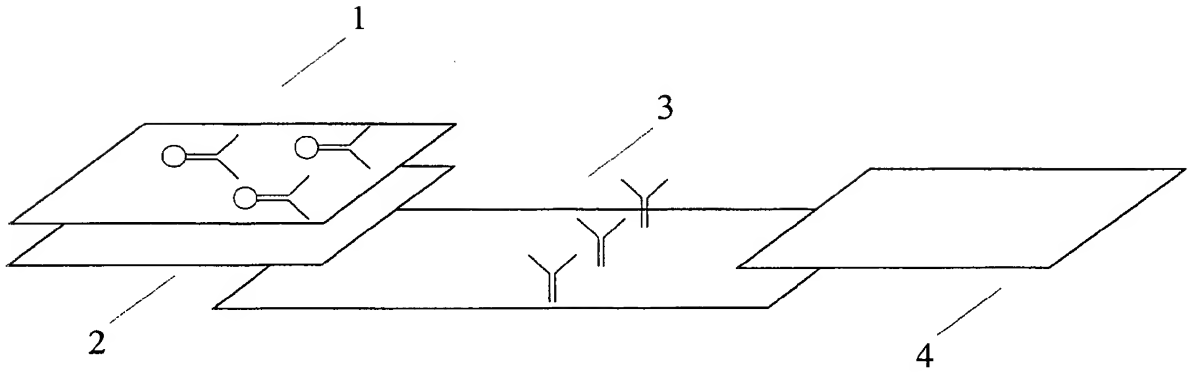

+1 E V Q L L E E S G G G L V K P G G
GAGGTGCAGC TGCTCGAGGA GTCTGGGGGA GGCTTAGTGA AGCCTGGAGG 50
+1 S L Q L S C S A S G F T F S S H F
GTCCCTGCAA CTCTCCTGTT CAGCCTCTGG ATTCACTTTC AGTAGCCATT 100
+1 M S W V R Q T P E K R L E W V A
TCATGTCTTG GGTTCGCCAA ACTCCAGAGA AGAGGCTGGA GTGGGTCGCA 150
+1 S I S S G G D S F Y P D S L K G R
TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGCCG 200
+1 F A I S R D N A R N I L F L Q M S
ATTCGCCATC TCCAGAGATA ATGCCAGGAA CATCCTGTTC CTGCAAATGA 250
+1 S L R S E D S A M Y F C T R D Y
GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC TCGGCCATGT ATTTCTGTAC AAGAGACTAC 300
+1 S W Y A L D Y W G Q G T S V T V S
TCTTGGTATG CTTTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC 350
+1 S
CTCA 400

Fig. 9



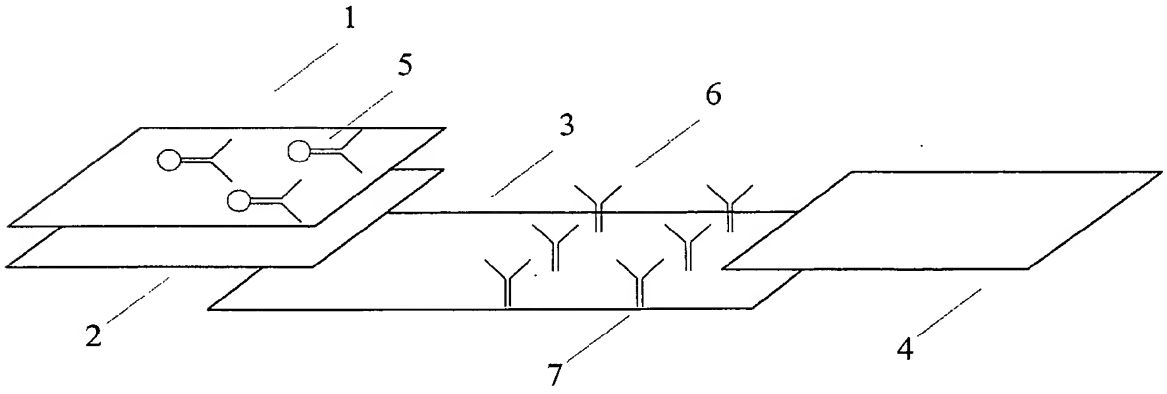


Fig. 10